

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI GENOVA  
SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE



Dipartimento di Scienze della Salute

*Corso di Dottorato di Ricerca in Metodologie innovative applicate a malattie trasmissibili e cronico-degenerative: epidemiologia, statistica, prevenzione, management e nursing.*

*Curriculum: Prevenzione del cancro e delle malattie cronico-degenerative e biostatistica*

# **STUDIO DI MOLECOLE PIRROLICHE NELLA TERAPIA ADIUVANTE DEL TUMORE AL POLMONE**

**XXX CICLO**

**Relatore:**

*Chiar.mo Prof. Alberto Izzotti*

**Dottoranda:**

*Dott.ssa Marta Geretto*

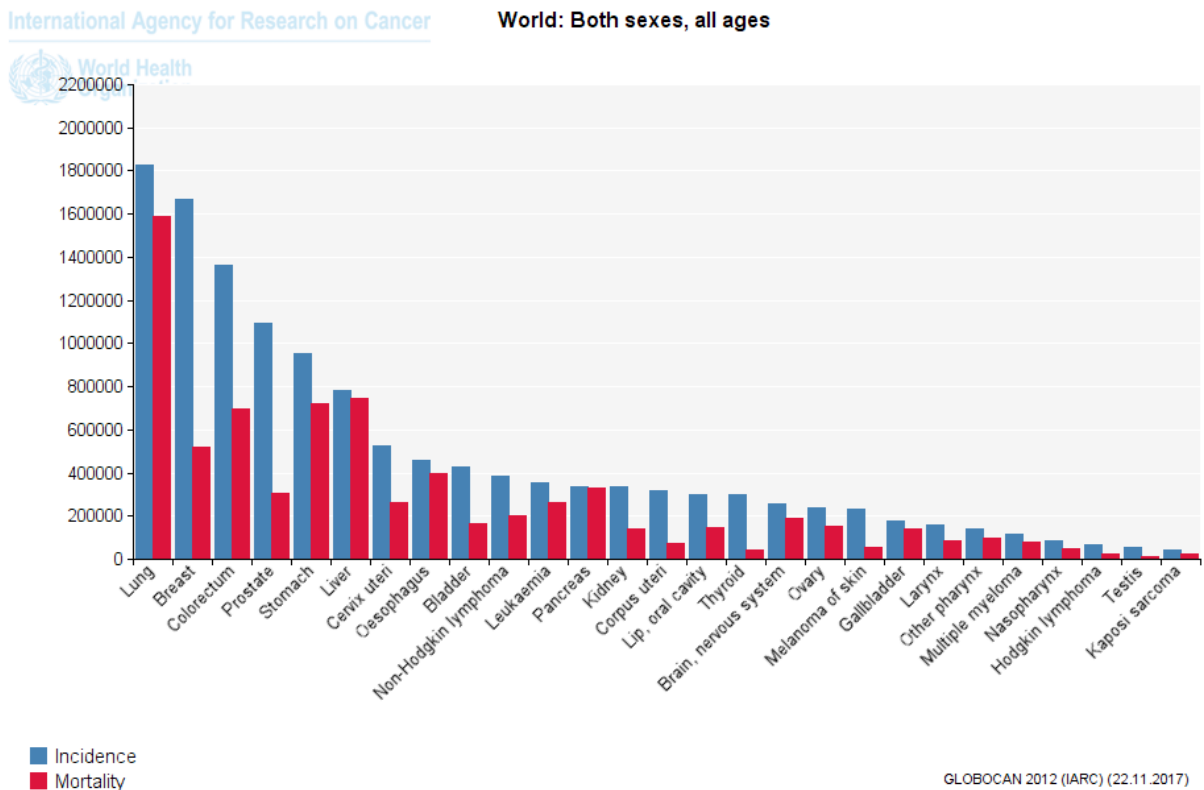
# Indice

1. Introduzione .....	3
1.1. Epidemiologia e prevenzione del tumore polmonare.....	3
1.2. Calix[n]pirroli.....	5
1.3. Obiettivo dello studio .....	6
2. Materiali e metodi .....	8
2.1. Sintesi e caratterizzazione dei derivati pirrolici .....	8
2.2. Preparazione delle nanoparticelle.....	14
2.3. Colture cellulari.....	14
2.4. Esperimento di time-course.....	14
2.5. Saggio di vitalità cellulare.....	15
2.6. Studio di farmacocinetica utilizzando la frazione metabolica S12 .....	15
2.7. Saggio con Annessina V .....	16
2.8. Comet Test.....	16
2.9. Addotti al DNA .....	17
2.10. Analisi di espressione dei microRNA .....	18
2.11. Simulazione di docking <i>in silico</i> .....	19
2.12. Studio preliminare <i>in vivo</i> .....	19
2.13. Analisi HPLC/massa .....	20
3. Risultati .....	22
3.1. Valutazione <i>in vitro</i> della citotossicità dei derivati calixpirrolici .....	22
3.2. Valutazione <i>in vivo</i> della farmacocinetica e della distribuzione organospecifica dei derivati calixpirrolici .....	40
4. Discussione .....	42
5. Conclusioni .....	44
6. Bibliografia .....	46

## 1. Introduzione

### 1.1. Epidemiologia e prevenzione del tumore polmonare

Il tumore al polmone rappresenta la neoplasia più frequente all'interno della popolazione e si configura come la principale causa di morte per tumore nel mondo. Il progetto GLOBOCAN 2012, condotto dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC), ha evidenziato la presenza di 1.8 milioni di nuovi casi di tumore al polmone in entrambi i generi (**Figura 1**), il 58% dei quali si è verificato nei paesi in via di sviluppo <sup>[1]</sup>.



**Figura 1.** Incidenza e mortalità delle diverse neoplasie a livello mondiale <sup>[1]</sup>.

In Italia, secondo le stime dell'Associazione Italiana Registri Tumori (AIRTUM), vengono effettuate ogni anno 38.200 nuove diagnosi di tumore polmonare, corrispondenti all'11% di tutte le diagnosi di tumore effettuate nella popolazione. Inoltre, il 15% di tali diagnosi interessa la popolazione maschile mentre il 6% quella femminile. Negli ultimi anni l'incidenza nel genere

maschile ha subito una diminuzione contrariamente a quanto accade per il genere femminile, per il quale si è osservato, invece, un aumento di incidenza. La spiegazione di questo fenomeno risiede nell'abitudine al fumo di tabacco che risulta in crescita nelle donne ed in diminuzione negli uomini <sup>[2]</sup>. Come sottolineato dall'American Cancer Society, il fumo di tabacco rappresenta il principale fattore di rischio legato all'insorgenza del tumore polmonare. Infatti, si stima che circa l'80% delle morti per tale tumore sia dovuto all'abitudine al fumo <sup>[3]</sup>. Esiste un evidente rapporto dose-effetto tra l'abitudine al fumo di tabacco e l'insorgenza del tumore polmonare, relazione che vale anche per quanto riguarda l'esposizione dei soggetti al fumo passivo. Tuttavia, sebbene il fumo di tabacco rappresenti il principale fattore di rischio per l'insorgenza del tumore polmonare, sono stati identificati altri fattori di rischio. Tra questi vi sono cancerogeni chimici, come amianto, radon, metalli pesanti che provocano tumore principalmente nei soggetti professionalmente esposti a tali sostanze, l'inquinamento atmosferico, una storia familiare di tumore polmonare (principalmente genitori, fratelli o sorelle), malattie polmonari pregresse o l'impiego di radioterapia per il trattamento di patologie a carico dei polmoni <sup>[2]</sup>.

Nonostante siano stati compiuti progressi nella terapia del tumore polmonare, quali ad esempio l'introduzione in clinica dei "farmaci biologici" utilizzati attualmente nei casi di tumore non a piccole cellule, la prognosi è spesso infausta. Nella maggior parte dei paesi la sopravvivenza a 5 anni è del 10%<sup>[4]</sup>. Una delle ragioni di un tasso di sopravvivenza così basso risiede nella capacità del tumore al polmone di dare luogo allo sviluppo di metastasi che interessano principalmente organi quali il cervello, l'osso ed il fegato <sup>[5]</sup>. I tumori primari e secondari che coinvolgono il cervello sono particolarmente complessi da gestire dal punto di vista terapeutico poiché la barriera emato-encefalica ostacola la penetrazione dei farmaci. Per queste ragioni riveste un ruolo chiave la prevenzione. L'incidenza del tumore al polmone e, di conseguenza, la mortalità ad esso correlata possono essere ridotte attraverso la diagnosi precoce, il trattamento della malattia, la chemioprevenzione, evitare il fumo di tabacco e smettere di fumare <sup>[6]</sup>. Tra gli interventi menzionati, solamente i programmi di prevenzione e di cessazione dell'abitudine al fumo hanno mostrato una riduzione del rischio di sviluppare tumore polmonare, inserendosi in questo modo nelle strategie di prevenzione primaria. Il rischio di insorgenza di tale tumore sembra essere inoltre legato all'età in cui un soggetto smette di fumare. Infatti, per coloro che avevano smesso di fumare alle età di 60, 50, 40 e 30 anni i rischi cumulativi di sviluppare tumore al polmone all'età di 70 anni erano rispettivamente il 10%, il 6%, il 3% ed il 2% <sup>[7]</sup>. Inoltre, i fumatori che hanno smesso da più di 15 anni hanno una riduzione del rischio di cancro ai polmoni dall'80% al

90% rispetto a coloro che continuano a fumare. La chemioprevenzione, che consiste nell'utilizzo di specifici agenti di tipo farmacologico o legati alla dieta al fine di prevenire il danno al DNA, fattore promuovente la cancerogenesi, può essere impiegata come strategia di prevenzione primaria, secondaria o terziaria. Tuttavia, sebbene diversi agenti chemiopreventivi abbiano dimostrato una buona efficacia nei trials clinici condotti, allo stato attuale non vengono utilizzati in clinica <sup>[8]</sup>. Tra gli interventi di prevenzione terziaria, il trattamento adiuvante finalizzato alla riduzione del rischio di recidiva viene spesso effettuato in pazienti affetti da carcinoma polmonare non a piccole cellule precedentemente sottoposti ad intervento chirurgico. Infatti, quest'ultimo non risulta sufficiente a garantire la guarigione dei pazienti in fase iniziale di malattia poiché la probabilità di recidiva interessa circa 1/3 dei pazienti sottoposti ad intervento di chirurgia radicale <sup>[9]</sup>.

## 1.2. Calix[n]pirroli

I Calix[n]pirroli sono composti macrociclici di origine sintetica, costituiti da unità pirroliche legate tra loro in posizione 2,5 con atomi di carbonio quaternario <sup>[10]</sup>. Il *meso*-Octametilcalix[4]pirrolo è conosciuto da oltre un secolo <sup>[11]</sup> ma l'interesse nei confronti di questa molecola e dei suoi derivati è aumentato rapidamente in seguito alla scoperta della loro capacità di formare complessi con anioni <sup>[10]</sup> e con molecole neutre <sup>[12]</sup> in grado di agire come accettori di legami idrogeno dalle unità NH pirroliche. A partire da questi lavori pionieristici, è stato sintetizzato un elevato numero di derivati calixpirrolici che sono stati studiati come ligandi selettivi per differenti anioni <sup>[13]</sup> <sup>[10]</sup>, per effettuare separazioni cromatografiche HPLC <sup>[14]</sup> e per isolare e rimuovere determinate sostanze da soluzioni, quali ad esempio l'arsenito e l'arsenato da campioni di acqua <sup>[15]</sup>. Nonostante la rilevanza biologica delle loro proprietà di legame, i Calixpirroli sono stati principalmente studiati dal punto di vista chimico. Tuttavia, recentemente, *Cafeo et al.* hanno sottolineato la capacità del *meso-p*-aminofenilcalix[4]pirrolo di formare un complesso citotossico con il trans-platino (*trans*-Pt(II)). All'interno di tale complesso l'unità calixpirrolica sembra favorire il trasporto del platino al DNA attraverso il legame preliminare ai residui di fosfato della doppia elica <sup>[16]</sup>. Lo studio appena menzionato risulta essere il primo relativo all'impiego dei derivati calixpirrolici in campo biomedico, in particolare nell'ambito del drug-delivery. Inoltre, nello studio di *Cafeo et al.* non sono stati riscontrati effetti citotossici significativi ad opera del

calixpirrolo puro (non coniugato con trans-Platino) e delle sue subunità. Oltre a questa considerazione, è stato sottolineato come i derivati calixpirrolici opportunamente progettati possano essere in grado di legare anioni biologicamente rilevanti, influenzando quindi la vitalità cellulare, tramite l'alterazione del trasporto di queste specie attraverso le membrane. Infatti, mentre questa idea è stata perseguita da diversi gruppi di ricerca <sup>[17]</sup> <sup>[18]</sup>, che focalizzavano il loro lavoro sugli effetti dei trasportatori di cloruri in relazione alla vitalità delle cellule, Cafeo *et al.* si sono concentrati sulla sintesi di recettori basati su calixpirroli al fine di legare altri anioni (bis-carbossilati) rilevanti nella fisiologia del cancro <sup>[19]</sup> <sup>[20]</sup>. Allo stesso tempo è stato anche scoperto che il *meso-octaetil-calix[4]pirrolo* agisce come antagonista del recettore 30 accoppiato alle G protein (GPR30) in diversi modelli sperimentali, come le cellule di tumore mammario e i fibroblasti associati al cancro <sup>[21]</sup>. Quest'ultimo lavoro indica chiaramente che i calixpirroli meritino ulteriori indagini come potenziali farmaci a pieno titolo, anziché solamente come vettori di specie biologicamente attive.

### 1.3. Obiettivo dello studio

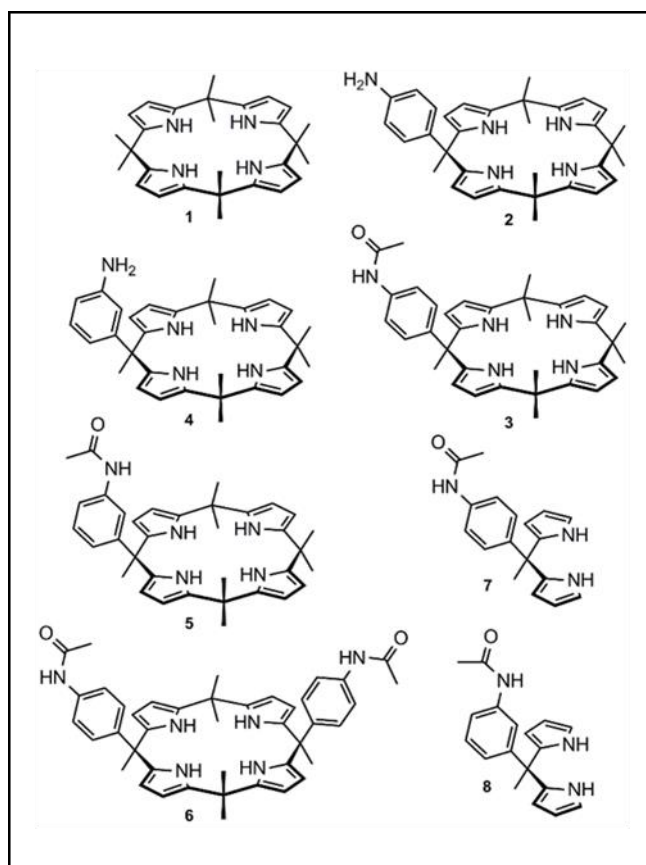
Alla luce dell'interesse nei confronti dei calixpirroli come molecole biologicamente attive, l'obiettivo del presente studio è stato quello di valutare l'efficacia di due derivati calixpirrolici altamente lipofili, qui denominati **107** e **563**, nei confronti di diverse linee cellulari tumorali (polmone, mammella, ovaio e glioblastoma). Nell'ambito dello studio, un particolare interesse è stato rivolto al tumore polmonare poiché rappresenta a livello mondiale il tipo di neoplasia maggiormente frequente e la causa più comune di morte per tumore in tutto il mondo, con un tasso di sopravvivenza del 10% a 5 anni. Uno dei motivi di un tasso di sopravvivenza così basso risiede nella capacità di tale neoplasia di dar luogo all'insorgenza di metastasi e di recidive, queste ultime ricorrenti in circa 1/3 dei pazienti affetti da carcinoma polmonare non a piccole cellule e sottoposti a chirurgia radicale. Per tali ragioni, il presente studio si colloca nell'ambito della prevenzione terziaria, proponendosi di ridurre il rischio di recidiva tramite la valutazione *in vitro* ed *in vivo* dell'efficacia di molecole pirroliche.

Oltre alle molecole **107** e **563** sono state indagate anche le proprietà del derivato calixpirrolico **452** poiché costituito da due unità para-acetamidiche (il doppio rispetto a quelle presenti in **107**) e dei composti **118** e **813** in quanto frammenti dipirrilici delle molecole **107** e **563**, rispettivamente. Inoltre, per quanto riguarda la capacità di indurre danno al DNA, è stato

effettuato un confronto tra **107** e **563** e le molecole **274** e **391** poiché, per **274**, ma non ancora per il suo isomero **391**, è stata dimostrata precedentemente la capacità di intercalare il DNA <sup>[16]</sup>.

L'attenzione è stata focalizzata principalmente sui meccanismi molecolari messi in atto dai calixpirroli al fine di determinare morte cellulare. Infine, a completamento degli studi *in vitro* su colture cellulari, è stato effettuato uno studio preliminare *in vivo* per valutare l'organotropismo dei calixpirroli testati.

Le formule di struttura dei calixpirroli utilizzati nel presente lavoro sono riportate in **Figura 2**.



**Figura 2.** Formule di struttura dei derivati calixpirrolici testati. (1) Calix[4]pirrolo, molecola capostipite; (2) **274**; (3) **107**; (4) **391**; (5) **563**; (6) **452**; (7) **118**; (8) **813**.

## 2. Materiali e metodi

### 2.1. Sintesi e caratterizzazione dei derivati pirrolici

I solventi utilizzati nella sintesi di tutti i composti descritti, sono stati essiccati mediante l'utilizzo di setacci molecolari (diametro dei pori 4 Å) o seguendo procedure standard <sup>[22]</sup>. Il pirrolo è stato distillato prima dell'uso. Tutte le altre sostanze chimiche utilizzate erano reagenti standard e, quindi, sono state impiegate senza ulteriore purificazione. Le reazioni sensibili all'aria e/o all'umidità sono state condotte in atmosfera inerte (Argon). La cromatografia su strato sottile è stata effettuata su piastre di plastica Merck SiO<sub>2</sub> 60F254. I composti sono stati visualizzati tramite vanillina o mediante visualizzazione sotto luce UV. La cromatografia su colonna è stata condotta usando gel di silice (Aldrich, 230-400 mesh, 60 Å). Gli spettri NMR (<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C) sono stati registrati su spettrometro Varian 500 con frequenza 500 e 125 MHz, rispettivamente; le risonanze protoniche residue del solvente (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) sono state utilizzate come valore di riferimento. Il solvente NMR è stato fornito in fiale sigillate e si è prestata attenzione a ridurre al minimo l'esposizione all'umidità.

La sintesi e la caratterizzazione dei derivati del calix[4]pirroli **274** (meso-(4-aminophenyl)-meso-hepta(methyl)calix[4]pyrrole) e **391** (meso-(3-aminophenyl)-meso-hepta(methyl)calix[4]pyrrole) sono state eseguite come precedentemente riportato [G. Cafeo, et al., 2013; Anzenbacher, et al., 2000]. Per quanto riguarda i derivati **107** (meso-(4-acetamidophenyl)-meso-hepta(methyl)calix[4]pyrrole) e **563** (meso-(3-acetamidophenyl)-meso-hepta(methyl)calix[4]pyrrole) si è proceduto come segue: una soluzione (2 mL DCM) di acetilcloruro (31,1 mg, 0,4 mmoli) è stata gradualmente aggiunta ad una sospensione di **274** o **391** (200 mg, 0,4 mmoli) con eccesso di K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in DCM (20 mL), a temperatura ambiente in atmosfera di argon. La reazione è stata monitorata mediante TLC (SiO<sub>2</sub>, DCM) fino alla completa scomparsa del materiale di partenza (30 min). La miscela di reazione è stata estratta con acqua (1 x 15 mL) e con una soluzione satura di NaHCO<sub>3</sub> (1 x 15 mL). La fase organica ottenuta è stata quindi essiccata (MgSO<sub>4</sub>) e concentrata a pressione ridotta. Il prodotto è stato sottoposto a cromatografia su colonna (SiO<sub>2</sub>, DCM, DCM / EtOAc, 9: 1) e il solido bianco ottenuto è stato caratterizzato senza ulteriore purificazione.



Infine, per la sintesi del derivato **452** (10 $\alpha$ , 20 $\alpha$ )-10,20-bis(4-acetamidophenyl)5,5,10,15,15,20-hexamethy-calix[4]pyrrole), una soluzione (2 ml DCM) di acetilcloruro (62,2 mg, 0,8 mmoli) è stata gradualmente aggiunta a una sospensione di **238** (10 $\alpha$ , 20 $\beta$ -bis(4-aminophenyl)-calix[4]pyrrole) (238,4 mg, 0,4 mmoli) in eccesso di K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in DCM (20 ml), a temperatura ambiente in atmosfera di argon. La reazione è stata monitorata mediante TLC (SiO<sub>2</sub>, DCM) fino alla completa scomparsa del materiale di partenza (30 min). La miscela di reazione è stata estratta con acqua (1 x 15 mL) e con una soluzione satura di NaHCO<sub>3</sub> (1 x 15 mL). La fase organica ottenuta è stata essiccata (MgSO<sub>4</sub>) e concentrata a pressione ridotta. Il prodotto è stato sottoposto a cromatografia su colonna (SiO<sub>2</sub>, DCM, DCM / EtOAc, 9: 1) ed il solido bianco ottenuto è stato caratterizzato senza ulteriore purificazione. Per ottenere le diverse soluzioni madre, i composti **107**, **274**, **391**, **452** e **563** sono stati sciolti in DMSO (Sigma-Aldrich, Milano, Italia). Tutte le soluzioni madre sono state ulteriormente diluite in siero bovino fetale (Biosigma, Cona, Venezia, Italia) prime di essere testate sulle colture cellulari.

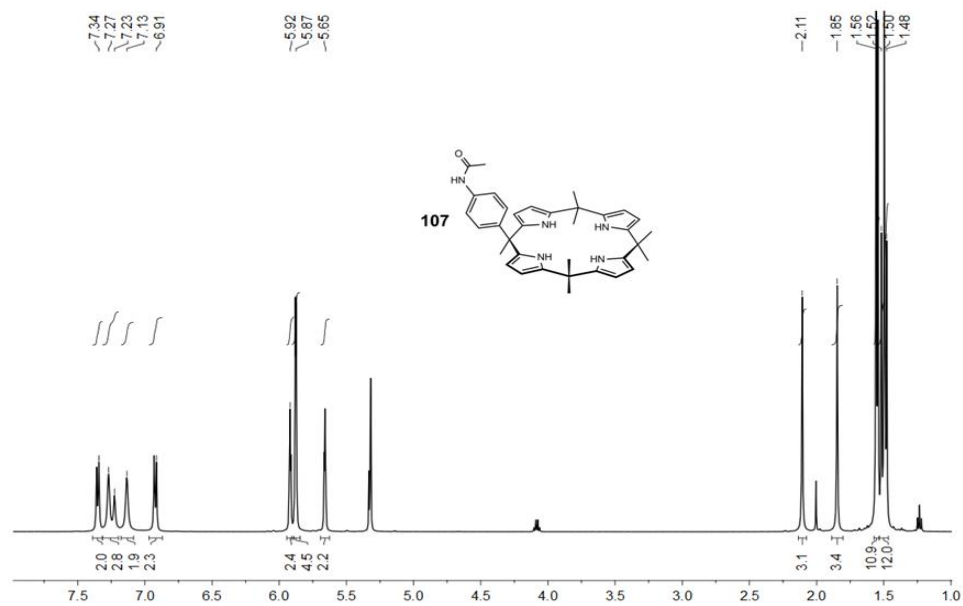
### ***Caratterizzazione NMR dei calixpirroli 107, 452 e 563***

Gli spettri NMR relativi alle molecole **107**, **452** e **563** sono riportati in **Figura 3**.

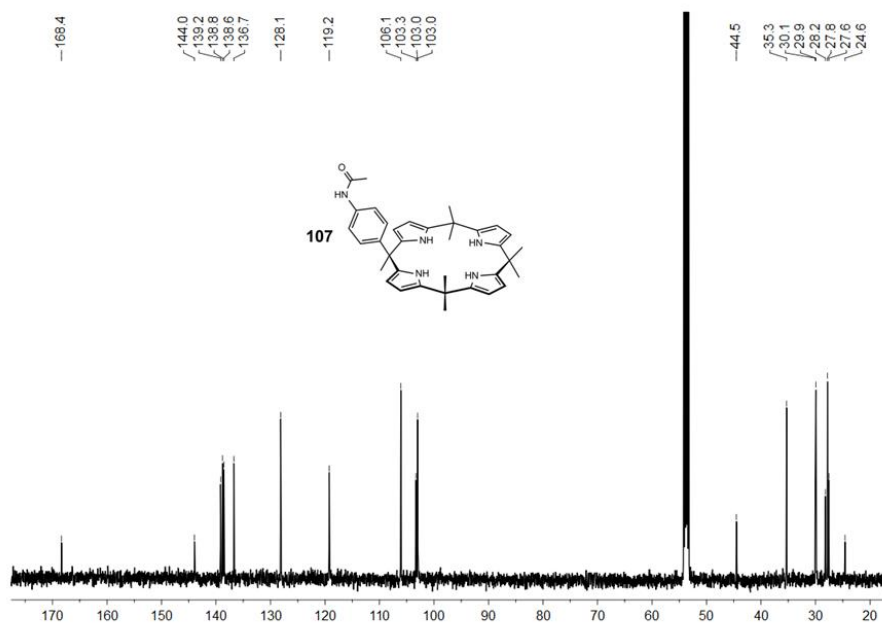
- meso-(4-acetamidophenyl)-meso-hepta(methyl)calix[4]pyrrole **107**: resa 49% (108 mg); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\delta$  1,48 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,50 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 1,52 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,56 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 1,85 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,11 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 5,65 (m, 2H, pirrolo b-CH), 5,87 (m, 4H, pirrolo b-CH), 5,91 (m, 2H, pirrolo b-CH), 6,91 (Sistema AB, 2H, Ar-CH), 7,13 (sb, 2H, pirrolo-NH), 7,23 (sb, 1H, NHCO), 7,27 (sb, 2H, pirrolo-NH), 7,34 (sistema AB, 1H, Ar CH); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\delta$  24,6, 27,6, 27,8, 28,2, 29,9, 30,1 (CH<sub>3</sub>), 35,3, 35,3, 44,5 (Cq), 103,0, 103,0, 103,3, 106,1 (pirrolo-CH), 119,2, 128,1 (Ar-CH), 136,7, 137,7, 138,6, 138,8, 139,2, 144,0 (Cq), 168,4 (CO).
- (10 $\alpha$ ,20 $\alpha$ )-10,20-bis(4-acetamidophenyl)5,5,10,15,15,20-hexamethy-calix[4]pyrrole **452**: resa 47% (125 mg); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\delta$  1,51 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 1,62 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 1,86 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 2,10 (s, 6H, COCH<sub>3</sub>), 5,63 (m, 4H, pirrolo b-CH), 5,92 (m, 4H, pirrolo b-CH), 6,89 (sistema AB, 4H, Ar-CH), 7,21 (sb, 2H, NHCO), 7,30 (sb, 4H, pirrolo-NH), 7,34 (sistema AB, 4H, Ar-CH); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\delta$  24,4 (COCH<sub>3</sub>), 26,9, 27,4, 30,0 (CH<sub>3</sub>), 34,9, 44,2 (Cq), 103,1, 105,8 (pirrolo-CH), 118,8, 127,8 (Ar-CH), 136,4, 138,4, 143,8 (Cq), 168,1 (CO).

- meso-(3-acetamidophenyl)-meso-hepta(methyl)calix[4]pyrrole **563**: resa 46% (100 mg);  
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 1,49 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 1,52 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,56 (s, 6H, CH<sub>3</sub>),  
1,87 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,07 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 5,72 (m, 2H, pirrolo b-CH), 5,88 (m, 4H, pirro-  
lo b-CH), 5,92 (m, 2H, pirrolo b-CH), 6,72 (d, 1H, Ar-CH), 7,04 (s, 1H, Ar-CH), 7,19 (t,  
1H, Ar-CH), 7,23 (sb, 1H, NHCO), 7,34 (sb, 2H, pirrolo-NH), 7,35 (d, 1H, Ar -CH), 7,48  
(sb, 2H, pirrolo-NH); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 24,5, 27,9, 27,9, 28,3, 29,9, 29,9  
(CH<sub>3</sub>), 35,3, 35,4, 44,9 (Cq), 103,0, 103,0, 103,1, 105,8 (pirrolo-CH), 118, 8, 120,1,  
123,9, 128,5 (Ar-CH), 136,5, 137,6, 138,7, 138,9, 139,3, 149,3 (Cq), 168,6 (CO).

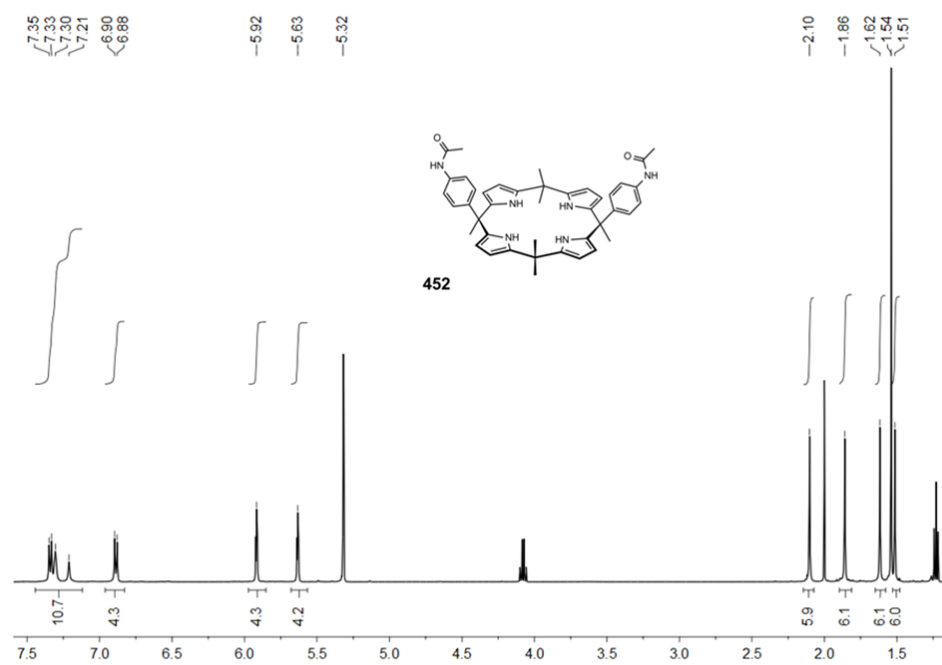
A1



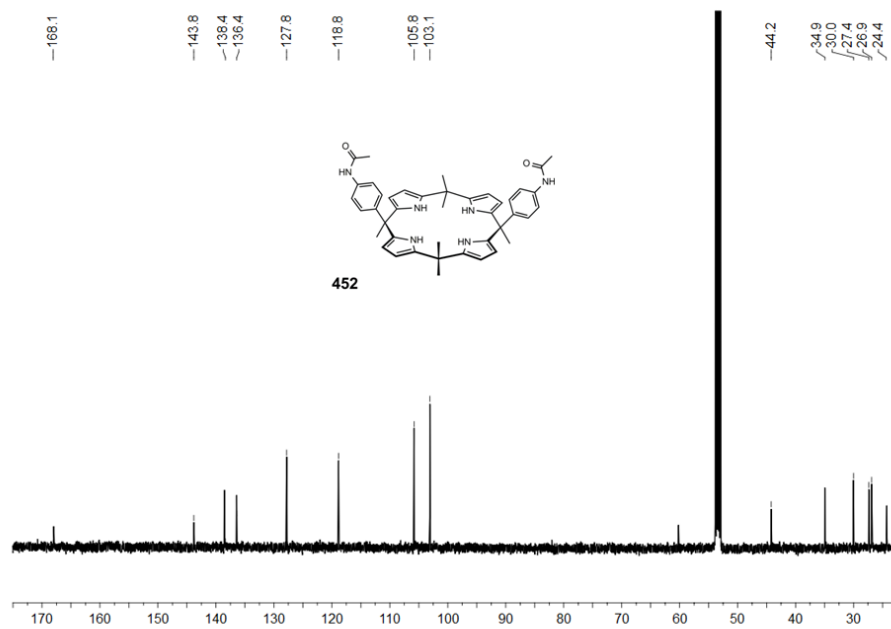
A2



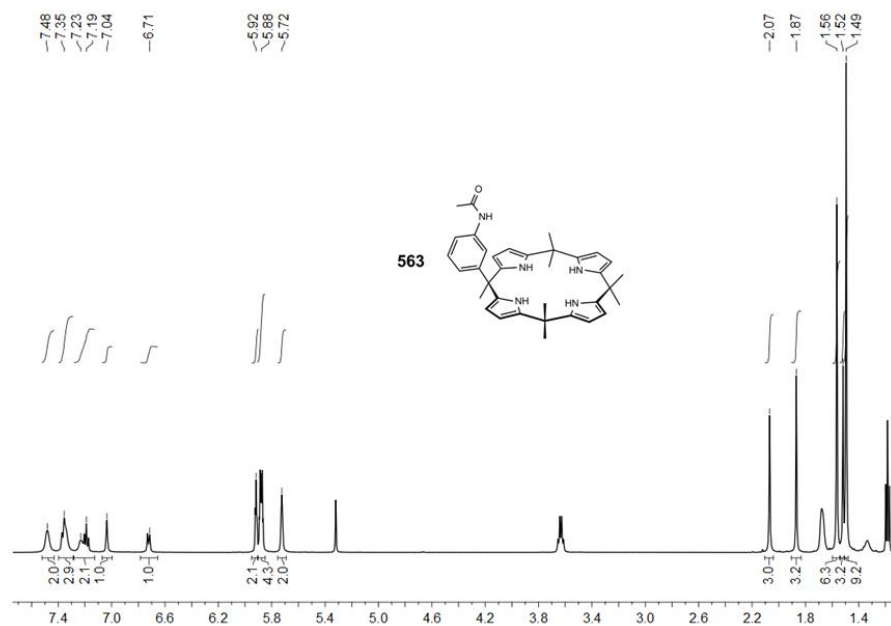
B1



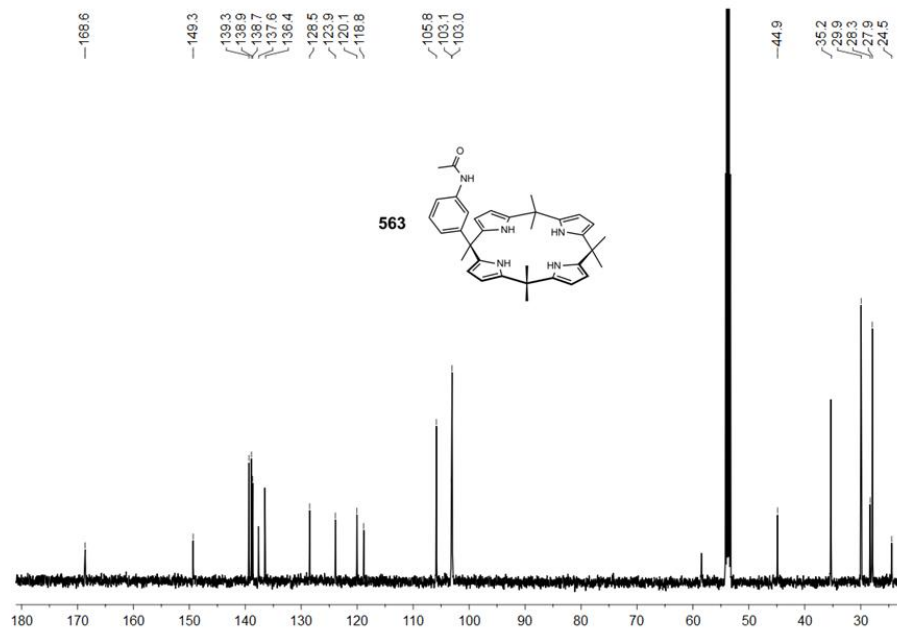
B2



C1



C2



**Figura 3.** Spettri NMR dei calixpirroli. *A1*: Spettro parziale <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) del calixpirrolo **107**; *A2*: Spettro <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) del calixpirrolo **107**; *B1*: Spettro parziale <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) del calixpirrolo **452**; *B2*: Spettro <sup>13</sup>C NMR (125 MHz,

CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) del calixpirrolo **452**; C1: Spettro parziale <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) del calixpirrolo **563**; C2: Spettro <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) del calixpirrolo **563**.

## 2.2. Preparazione delle nanoparticelle

Nanoparticelle liposomiche (NPs) sono state preparate come descritto da Pulliero *et al.* [23] ed utilizzate alla concentrazione di 8 ug/mL. Prima di essere somministrate alle cellule, le NPs sono state incubate con le molecole **107** e **563** per 15 minuti a temperatura ambiente. Infine, NPs pure sono state utilizzate come controlli.

## 2.3. Colture cellulari

Le linee cellulari umane H727 (tumore polmonare non a piccole cellule), A549 (carcinoma polmonare ad elevata aggressività), U87MG (glioblastoma) sono state acquistate dalla Banca Cellule Cell Factory dell'Ospedale Policlinico San Martino di Genova. Le cellule sono state coltivate rispettivamente in RPMI (Pan-Biotech, Aidenbach, Germania), in DMEM (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) ed in DMEM high glucose (Sigma-Aldrich, Milano, Italia), integrati con il 10% di siero fetale bovino (Euroclone, Milano, Italia), 2 mM di L-Glutammina (Euroclone, Milano, Italia) e l'1% di Penicillina-Streptomicina (Euroclone, Milano, Italia).

Le linee cellulari umane di tumore mammario MCF7, ER+, e MDA-MB-231, ER-triplo negativo, (Cell Factory, Ospedale Policlinico San Martino, Genova) sono state coltivate in DMEM integrato con il 10% di siero fetale bovino, 2mM di L- Glutammina e 100 ug/ml di Penicillina-Streptomicina (Bio Whittaker Cambrex, Versiers, Belgio).

La linea cellulare umana di tumore ovarico SKOV3 (ATCC, Manassas, VA) è stata coltivata in RPMI 1640 integrato con il 10% di siero fetale bovino, 2mM di L- Glutammina e 100 ug/ml di Penicillina-Streptomicina (Bio Whittaker Cambrex, Versiers, Belgio).

Tutte le linee cellulari utilizzate sono state mantenute in incubatore alla temperatura di 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub>.

## 2.4. Esperimento di time-course

L'esperimento di time-course è stato realizzato trattando le cellule A549 con i calixpirroli **107** e **563** alla concentrazione di 5 uM. La reazione è stata bloccata a diversi tempi, dopo 3, 6, 12,

24 e 48 ore di trattamento. Le cellule sono state quindi fissate in Formalina, colorate con Cristal Violetto e la lettura dei campioni è stata effettuata utilizzando il fotometro per micropiastre (Multiskan FC, Thermo Scientific) alla lunghezza d'onda di 570 nm. La significatività statistica è stata calcolata mediante Test t di Student.

## **2.5. Saggio di vitalità cellulare**

L'azione dei calixpirroli **107** e **563**, utilizzati alle concentrazioni di 5 uM, 10 uM, 20 uM, 30 uM e 50 uM, è stata determinata tramite saggio MTT su cellule di tumore polmonare (A549 e H727), di glioblastoma (U87MG), tumore mammario (MCF7 e MDA-MB-231) ed ovarico (SKOV3). Le cellule sono state seminate in piastre da 96 micropozzetti a fondo piatto ad una densità di  $6 \times 10^3$  cellule per pozzetto in 100 uL di terreno di coltura. Il giorno seguente, 100 uL di terreno di coltura contenente differenti concentrazioni (5 uM - 50 uM) dei calixpirroli **107** e **563** è stato aggiunto alle cellule e lasciato in incubazione per 24 ore. I controlli sono stati realizzati utilizzando DMSO a differenti concentrazioni (0.05 %, 0.1%, 0.5%, 1%, vol/vol in terreno). I risultati sono espressi come percentuale rispetto ai controlli. Gli effetti delle NPs coniugate con **107** e **563** sono stati testati solamente sulle cellule della linea tumorale polmonare H727. Per le cellule trattate con le NPs è stato utilizzato il terreno di coltura OptiMEM (Life Technologies, Carlsbad, California, Stati Uniti), al fine di impedire la precipitazione delle NPs stesse. NPs prive delle molecole **107** e **563** sono state utilizzate come controllo.

Allo scadere delle 24 ore di trattamento, sono stati aggiunti 10 uL della soluzione stock MTT (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio5 mg/mL Sigma-Aldrich, Milano, Italia) e si è proceduto con un tempo di incubazione di 3 ore. Trascorse le 3 ore, il terreno di coltura contenente MTT è stato rimosso ed il precipitato di formazano è stato risospeso in 100 uL di DMSO. La lettura dei campioni è stata effettuata utilizzando il fotometro per micropiastre (Multiskan FC, Thermo Scientific) alla lunghezza d'onda di 570 nm. Per ogni condizione sperimentale sono stati effettuati 8 replicati e sono state calcolate media e deviazione standard. La significatività statistica è stata calcolata mediante Test t di Student.

## **2.6. Studio di farmacocinetica utilizzando la frazione metabolica S12**

Le cellule di carcinoma polmonare della linea A549 sono state seminate in piastre da 96

micropozzetti a fondo piatto ad una densità di  $6 \times 10^3$  cellule per pozzetto in 100 uL di terreno di coltura DMEM (Sigma-Aldrich, Milano, Italia). Il giorno seguente, i calixpirroli **107** e **563**, entrambi alla concentrazione di 5 uM, sono stati aggiunti individualmente ad una “soluzione mix” contenente acqua deionizzata (33,2% v/v), tampone fosfato salino (PBS, 50% v/v, Euroclone, Milano, Italia), nicotinammide adenina dinucleotide fosfato (NADP, 4% v/v, Sigma-Aldrich, Milano, Italia), glucosio 6-fosfato (G6P, 0,5% v/v, Sigma-Aldrich, Milano, Italia),  $MgCl_2$  (2% v/v, BDH, VWR International, Milano, Italia) e la frazione epatica S12 (10.3% v/v) [24]. Le soluzioni contenenti ciascuna un calixpirrolo (alternativamente **107** o **563**) sono state incubate a 37 °C per 30 minuti. Le cellule sono state sottoposte a trattamento con queste soluzioni per un periodo di tempo pari a 12 ore. Come condizioni controllo sono state utilizzate cellule A549 con lo 0.05% di DMSO e cellule con la sola “soluzione mix” priva delle molecole calixpirrolliche. La significatività statistica è stata calcolata mediante Test t di Student.

## 2.7. Saggio con Annessina V

Le cellule A549, seminate in piastre da 6 pozzetti a fondo piatto ad una alla densità di  $2 \times 10^5$  cellule per pozzetto con 1 mL di terreno di coltura DMEM (Sigma-Aldrich, Milano, Italia), sono state trattate per 24 ore con i calixpirroli **107** e **563** alla concentrazione di 5 uM. Trascorse le 24 ore di trattamento è stato effettuato il saggio Muse™ Annexin V & Dead Cell Assay al fine di identificare il principale meccanismo di morte cellulare. Brevemente, le cellule sono state staccate da ogni pozzetto per ottenere una sospensione cellulare e 100 uL di questa sospensione è stata aggiunta ad un'uguale quantità di reagente Muse™ Annexin V & Dead Cell (BD Biosciences Pharmingen 2350 Qume Drive San Jose, California, USA). I campioni sono stati vortexati a velocità media per 3-5 secondi e successivamente si è proceduto con la loro colorazione effettuata al buio e a temperatura ambiente per 20 minuti. Infine, i campioni sono stati analizzati al citofluorimetro (FACS Canto II cytometer, Becton Dickinson BD).

## 2.8. Comet Test

Le cellule A549, seminate in piastre da 6 pozzetti a fondo piatto ad una alla densità di  $2 \times 10^4$



cellule per pozzetto con 1 mL di terreno di coltura DMEM (Sigma-Aldrich, Milano, Italia), sono state trattate con le molecole **107**, **274**, **391** e **563** alla concentrazione di 5  $\mu$ M. Dopo 24 ore di trattamento, le cellule sono state dissociate tramite l'utilizzo dell'enzima tripsina (Euroclone, Milano, Italia), centrifugate a 1000 rpm per 5 minuti, risospese in agarosio low-melting-point 1% (w/v) a una concentrazione di  $1 \times 10^4$  cells/mL, applicate sulla superficie di un vetrino da microscopio e lasciate a 4 °C per 5 minuti per formare un microgel. I vetrini sono stati poi immersi in un buffer di lisi (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 10) a cui sono stati aggiunti l'1% Triton X-100 ed il 10% DMSO e sono stati lasciati overnight a 4°C. Al fine di svolgere la doppia elica del DNA e di effettuare la corsa elettroforetica, è stata preparata una soluzione alcalina (0.3 M NaOH, 1 mM EDTA, pH 13). L'elettroforesi è stata effettuata a 300 mA e 25 V. Dopo la fase di neutralizzazione, i vetrini sono stati disidratati con etanolo assoluto. L'analisi dei campioni è stata effettuata in seguito a colorazione dei vetrini con etidio bromuro (2  $\mu$ g/ml in H<sub>2</sub>O) utilizzando un microscopio a fluorescenza, con ingrandimento 200 X (Leica Microsystem, Mannheim, Germania), dotato di fotocamera digitale. Le immagini di almeno 100 nuclei selezionati in maniera casual sono state acquisite ed analizzate attraverso il software CASP (Project, <http://www.casp.sourceforge.net>).

Il danno al DNA (siti alcalino-labili e rotture del DNA sia a doppio che a singolo filamento) è stato quantificato in termini di percentuale di DNA contenuto nelle code delle comete (% tail DNA). Tutti i risultati sono stati espressi come media  $\pm$  SD. La significatività statistica è stata valutata mediante ANOVA test e test t di Student <sup>[25]</sup>.

## 2.9. Addotti al DNA

Le cellule A549, coltivate in due fiasche per colture cellulari delle dimensioni di 75 cm<sup>2</sup>, sono state trattate per 24 ore, una con il calixpirrolo **107** e l'altra con **563**, entrambi alla concentrazione di 5  $\mu$ M. Cellule coltivate in una terza fiasca per colture cellulari delle stesse dimensioni delle precedenti e prive di trattamento sono state utilizzate come controllo. Le cellule sono state dissociate dalle fiasche utilizzando l'enzima tripsina e il DNA è stato estratto secondo le istruzioni riportate nel kit commerciale (GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit, Sigma-Aldrich, Milano, Italia). In seguito ad estrazione in butanolo, sono stati saggiati tramite <sup>32</sup>P postlabeling 6  $\mu$ g di DNA al fine di valutare la presenza di addotti <sup>[26]</sup>.

## 2.10. Analisi di espressione dei microRNA

Le cellule A549, coltivate in due fiasche per colture cellulari delle dimensioni di 75 cm<sup>2</sup>, sono state trattate per 24 ore, una con il calixpirrolo **107** e l'altra con **563**, entrambi alla concentrazione di 5 uM. Cellule coltivate in una terza fiasca per colture cellulari delle stesse dimensioni delle precedenti e prive di trattamento sono state utilizzate come controllo. L'RNA totale è stato estratto dalle cellule secondo quanto riportato nelle istruzioni del kit commerciale (miRNeasy, Qiagen, Valencia, CA, USA). Dopo l'estrazione l'RNA è stato eluito in 80 uL di acqua ultrapura. La quantità e la purezza dell'RNA estratto sono state valutate mediante lo spettrofotometro a fibre ottiche (Nanodrop ND-1000, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Per valutare l'espressione dei microRNA, è stato utilizzato il kit commerciale 7th generation miRCURY LNA™ microRNA Array (Exiqon, Vedbaek, Danimarca), che contiene 3100 sonde di cattura che coprono uomo, topo e ratto. Nello specifico, questo microarray analizza l'espressione di 1928 microRNA umani. L'RNA totale di ogni campione è stato marcato utilizzando il kit commerciale Label IT® miRNA Labeling Kits, version 2 (Mirus Bio, Madison, WI, USA) e seguendo il protocollo standard indicato nelle istruzioni. L'RNA totale (500 ng) è stato mescolato con 10 uL di buffer di marcatura 10X, 4 uL di reagente Label IT (contenente i traccianti fluorescenti Cy 3 o Cy 5) e acqua fino a raggiungere 86 uL. I campioni sono stati incubati a 36°C per 1 ora e la reazione è stata bloccata aggiungendo 10 uL di Stop Reagent. I campioni marcati diversamente con Cy3 o con Cy5 sono stati purificati su colonna cromatografica ed eluiti in 25 uL di Elution buffer. In seguito, sono stati aggiunti 25 uL di 2× hybridization solution (EXIQON, Denmark) e la miscela ottenuta è stata denaturata a 65°C per 3 minuti. La miscela è stata quindi trasferita sui vetrini per microarray e coperta con vetrini coprioggetto. L'ibridazione è stata realizzata su GlassArray Hybridization Cassettes (Invitrogen Ltd, Paisley, UK) in un bagnetto termostato a 37°C per 16 ore e successivamente è stata effettuata una sequenza di lavaggi. L'array è stato fatto asciugare tramite centrifugazione e scansionato con uno scanner a laser (ScanArray, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) per rilevare i segnali fluorescenti prodotti da ogni sonda presente su vetrino effettivamente ibridizzata con il corrispondente microRNA <sup>[27]</sup>.

### 2.11. Simulazione di docking *in silico*

Le simulazioni di docking sono state eseguite impiegando il software Autodock v.4.2.2. [28], utilizzando i parametri standard suggeriti dal programma. E' stata utilizzata una griglia di ricerca che racchiudesse l'intera superficie del frammento di DNA modello. La simulazione è consistita in 100 iterazioni di calcolo tramite un Algoritmo Genetico "Lamarckiano". Le posizioni di docking generate sono state classificate in ordine crescente di valori di energia di interazione. Le soluzioni sono state raggruppate in "cluster" in base a un valore di cut-off sullo spostamento quadratico medio (RMSD) pari a 2,0 Å. In questo modo, è stato possibile asserire che la posizione di **107** corrispondente al valore minimo di energia del cluster più popolato corrisponda all'interazione più probabile della molecola con il DNA.

Come bersaglio molecolare nelle simulazioni di docking è stata usata la struttura tridimensionale di un frammento di DNA determinata mediante cristallografia a raggi X. La struttura della molecola **107** è stata disegnata e minimizzata energeticamente utilizzando il programma MarvinSketch [ChemAxon Ltd, Budapest, Hu]; nelle simulazioni, il composto **107** è stato considerato un'unità flessibile (la rotazione di tutti i possibili angoli rotazionali è stata lasciata libera) mentre il frammento di DNA è stato considerato come un oggetto rigido. La Figura 12 è stata disegnata utilizzando il programma Chimera [29].

### 2.12. Studio preliminare *in vivo*

Sulla base dell'efficacia osservata *in vitro*, il calixpirrolo **107** è stato scelto per realizzare gli studi *in vivo*. La sfida principale è stata riuscire a trovare un solvente, non tossico per il topo, in cui fosse possibile sciogliere **107**. A questo scopo, sono stati effettuati test di solubilità utilizzando diversi solventi, come olio di oliva, glicole propilenico (PEG), nanoparticelle liposomiche, soluzione acquosa di cloruro di sodio 2M e dimetil solfossido (DMSO). Utilizzando separatamente tutti questi solventi, anche se la soluzione veniva scaldata, sono state ottenute delle sospensioni della molecola **107**, fatta eccezione per il DMSO. Come osservato precedentemente *in vitro*, il DMSO è in grado di sciogliere il calixpirrolo **107** ma se utilizzato a concentrazioni superiori al 10% risulta tossico per il topo. Per tale ragione, sono state preparate due soluzioni, entrambe contenenti il 10% di DMSO: la prima era costituita da PBS e la seconda da nanoparticelle liposomiche. In entrambi i casi è stata osservata la formazione di un precipitato

bianco. Infine, è stata preparata una soluzione di DMSO al 10% in olio di oliva ed è stata osservata una completa dissoluzione della molecola **107**.

Per gli studi *in vivo* sono stati utilizzati topi A/J e, al fine di determinare la concentrazione ideale del calixpirrolo **107** da iniettare nei topi, è stato utilizzato il Web Server PROTOX (<http://tox.charite.de/tox/index.php?site=home>) che ha suggerito per la molecola **107** una LD50 per via orale di 920 mg/kg nei roditori. In primo luogo, dal momento che è stato deciso di non somministrare **107** per via orale ma per via parenterale, si è partiti con la somministrazione di una dose minore di tale molecola (5 mg/Kg). In seguito, la concentrazione di **107** è stata aumentata prima di 5 e poi di 50 volte, cambiando la via di somministrazione da sottocutanea ad intraperitoneale.

### 2.13. Analisi HPLC/massa

Al fine di determinare la presenza del calixpirrolo **107** in differenti organi e tessuti del topo, è stata effettuata un'analisi cromatografica HPLC accoppiata ad un'analisi di spettrometria di massa (HPLC/MS). A questo scopo, sono stati iniettati sottocute nel topo 228 mg/Kg di **107** e dopo 5 giorni l'animale è stato sacrificato e sono stati prelevati i seguenti organi e tessuti: cuore, polmoni, cervello, milza, omento, rene, fegato e tessuto sottocutaneo dorsale corrispondente al sito di iniezione. La stessa quantità (87 mg) di ogni organo è stata utilizzata per effettuare l'analisi HPLC/MS. Secondo il protocollo <sup>[30]</sup>, ogni campione è stato risospeso in acqua (10 ug/mg) e omogenato per 3 minuti alla frequenza di 30 s<sup>-1</sup> utilizzando lo strumento TissueLyser (Qiagen, Hilden, Germania). In seguito, è stato aggiunto etanolo ad ogni campione (rapporto: 2/3 etanolo and 1/3 omogenato). Il campione è stato quindi vortexato, centrifugato a 13.200 rpm per 10 minuti e d è stato raccolto il surnatante. Questa fase è stata ripetuta utilizzando un uguale volume di etanolo ed omogenato. I surnatanti sono stati conservati a - 80°C fino al momento dell'analisi. Al fine di determinare la biodistribuzione del composto 107 nell'organismo del topo, 3 ml del campione in esame sono stati iniettati su una colonna di 1.0 mm x 150 mm, particelle Symmetry 300 C18 (Waters Corp., Milford, MA) con pori di dimensioni di 300 Å. I buffer di eluizione erano costituiti rispettivamente di 95% di acqua - 5% di acetonitrile (eluente A) e 5% di acqua - 95% di acetonitrile (eluente B), entrambi contenenti lo 0,1% di acido formico. Il flusso è stato impostato a di 20 µl / minuto ed il processo condotto a 25 C. Il processo di eluizione è stato isocratico con eluente B al 50% per 10 minuti seguita da un gradiente lineare con eluente B

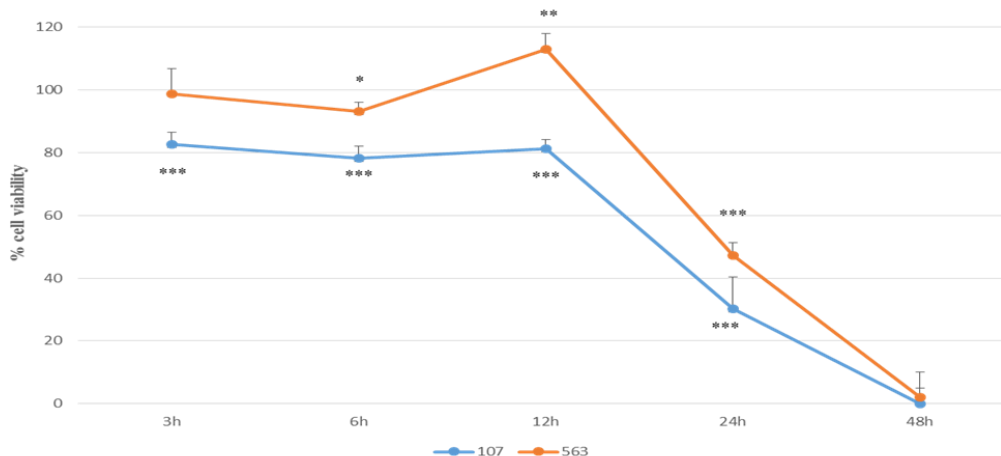
crescente dal 50% al 100% in 20 minuti. B è stato mantenuto al 100% per 10 ulteriori minuti e, infine, riportato al 50% con un gradiente lineare in 2 minuti. Il tempo di riequilibrio con il solvente B al 50% è stato di 10 minuti. Dopo la separazione HPLC, l'eluente è stato inviato direttamente a un TOF-MS Agilent 6210 dotato di una sorgente elettrospray di ioni. Gli spettri di massa a scansione totale negativa sono stati registrati utilizzando il software Mass Hunter di Agilent nell'intervallo di massa di  $m/z$  100-1000. Sono stati applicati i seguenti parametri operativi: tensione capillare: 3000 V; pressione del nebulizzatore: 20 psig; gas di essiccazione: 5 L / min; temperatura del gas: 300 ° C; tensione del frammentatore: 3500 V; tensione dello skimmer: 60 V; ottapolo RF: 250 V. I dati di scansione completa sono stati elaborati utilizzando l'analisi qualitativa di MassHunter di Agilent, ver. B.02.00 software. La quantità di composto 107 è stata misurata mediante area di picco di corrente di ioni estratti (EIC) (EIC  $m/z$  543,31 [M-H]<sup>-</sup>).

### 3. Risultati

#### 3.1. Valutazione *in vitro* della citotossicità dei derivati calixpirrolici

L'esperimento di time-course effettuato su cellule di carcinoma polmonare ad alta aggressività della linea A549 (**figura 4**) ha mostrato che, in seguito a trattamento con entrambe le molecole pirroliche, **107** e **563**, si verifica un elevato tasso di mortalità (misurato tramite metodo di colorazione con Cristal Violetto) dopo 24 ore di trattamento mentre dopo 3, 6 e 12 ore non è ancora possibile rilevare effetti citotossici significativi. Al contrario, dopo 48 ore di trattamento la mortalità risulta pari al 100%.

Sulla base di tali premesse, nel presente studio sono state valutate *in vitro* le proprietà citotossiche di differenti derivati calixpirrolici (qui denominati **107**, **452** e **563**) nei confronti di linee cellulari tumorali polmonari, mammarie, ovariche e di glioblastoma. Nello studio sono state incluse anche le molecole **118** e **813** poiché rappresentano frammenti dipirrilici dei derivati **107** e **563**, rispettivamente. La tabella 1 riassume l'attività citotossica (rappresentata come percentuale di vitalità residua) osservata ai tempi indicati alla concentrazione di 5  $\mu$ M.



**Figura 4** – Effetti delle molecole **107** e **563** sulla vitalità cellulare (Cristal violetto). Linea cellulare di carcinoma polmonare A549 trattata con calixpirrolo **107** (linea blu) e con calixpirrolo **563** (linea arancione) alla concentrazione di 5  $\mu$ M. Nel grafico risulta visibile un decremento

tempo-dipendente della vitalità cellulare confrontato con il controllo (vitalità pari al 100%). \*\*\* P<0.001; \*\* P<0.01; \* P<0.05

**Tabella 1.** Concentrazione delle molecole calixpirroliche necessaria ad indurre una diminuzione del 50% della vitalità cellulare. Il colore sullo sfondo indica l'efficacia della molecola su una specifica linea cellulare; più scuro è il colore, maggiore è l'efficacia. N.T.= non testato.

Entry	Cell Types	p-NHAc <b>107</b>	p-NH2 <b>274</b>	m-NHAc <b>563</b>	m-NH2 <b>391</b>	Bis- p- NHAc <b>452</b>	Dipyr p- NHAc <b>118</b>	Dipyr m- NHAc <b>813</b>	Evaluation time in hours
1	H727 LESS AGGRESSIVE LUNG	<5	N.T.	<5	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	24.0
2	A549 HIGHLY AGGRESSIVE LUNG	<5	50<d<100	<5	50<d<100	>100	>100	>100	24.0
3	MCF-7 BREAST ER+	20<d<30	100	10<d<20	>100	N.T.	>100	>100	48.0
4	MDA-MD-231 BREAST TRIPLE NEGATIVE	10<d<20	50<d<100	10<d<20	>100	N.T.	N.T.	N.T.	48.0
5	SKOV3 OVARIAN	20<d<30	50<d<100	5<d<10	50<d<100	N.T.	>100	>100	48.0
6	U87MG GLIOBLASTOMA	50<d<100	N.T.	50<d<100	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	24.0

Il saggio MTT effettuato su cellule di tumore polmonare della linea H727 (**Figura 5, pannello A**) mostra che i composti **107** e **563** risultano efficaci nel ridurre la vitalità cellulare già alla dose minore (5 uM), senza presentare particolari differenze di comportamento tra le diverse dosi testate. L'utilizzo di nanoparticelle di natura lipidica (NPs) volto ad incrementare la captazione delle molecole pirroliche da parte delle cellule non si è dimostrato efficace,

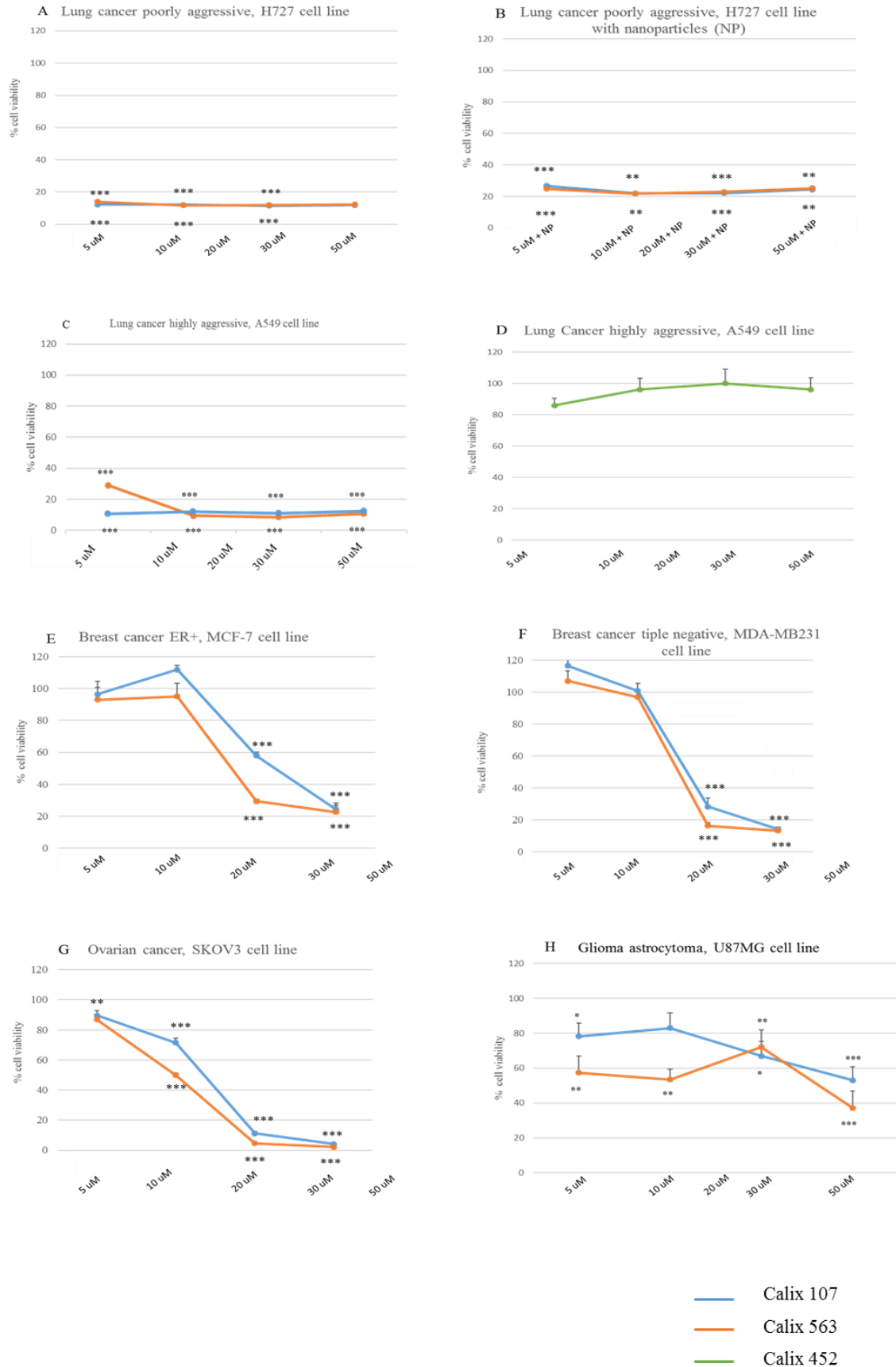
determinando, al contrario, una riduzione dell'efficacia delle molecole **107** e **563** (**Figura 5, pannello B**). Questa osservazione può essere dovuta all'elevata lipofilità dei derivati pirrolici testati. Infatti, tali molecole si trovano in uno stato energetico più favorevole quando sono situate all'interno delle NPs rispetto all'ambiente acquoso della cellula.

In relazione alla riduzione della vitalità cellulare, i derivati pirrolici **107** e **563** si sono mostrati leggermente più efficaci su cellule tumorali polmonari scarsamente differenziate (A549) rispetto a quelle maggiormente differenziate (H727) (**Figura 5, pannello C e Tabella 1 riga 2**).

I test MTT sono stati eseguiti anche su cellule di glioblastoma (U87MG), cellule di tumore mammario (MCF-7 e MDA-MB-231) ed ovarico (SKOV-3). Come mostrato in Figura, le molecole **107** e **563** risultano scarsamente efficaci sulle cellule della linea U87MG (**Figura 5, pannello H**). Considerando le cellule di tumore mammario (MCF-7 e MDA-MB-231), **107** e **563** hanno mostrato la loro efficacia maggiore dopo 48 ore di trattamento a concentrazioni comprese tra 10 uM e 30 uM, con una maggiore efficacia per quanto riguarda la molecola **563** (**Figura 5, pannelli E ed F**). Tale attività sembra indipendente dallo stato recettoriale della linea cellulare testata (le cellule MCF-7 sono positive al recettore degli estrogeni (ER+) mentre le MDA-MB231 sono triplo negative) ed è limitata alle dosi comprese tra 5 uM e 10 uM. In ogni caso, **107** e **563** risultano notevolmente più efficaci nei confronti della linea cellulare di tumore ovarico SKOV3 dopo 48 ore di trattamento (**Figura 5, pannello G**) rispetto alle linee MCF-7 e MDA-MB-231. In particolare, la molecola **563** sembra maggiormente efficace di **107** nei confronti di queste linee cellulari, con una vitalità del 50% alla concentrazione di 10 uM della molecola somministrata.

Il derivato calixpirrolico **452** è stato testato poiché contiene due unità para-acetamidiche che rappresentano due delle frazioni che contribuiscono a determinare le proprietà citotossiche di **107**. Pertanto, è risultato di notevole interesse stabilire se **452** mostrasse una maggiore attività citotossica rispetto a **107**. Al fine di effettuare tale confronto, è stato eseguito un saggio MTT in seguito a trattamento delle cellule di carcinoma polmonare A549 con la molecola **452** poiché questa linea cellulare è risultata quella maggiormente interessata dall'efficacia di **107**. Dopo 24 ore di trattamento, non sono stati rilevati effetti citotossici significativi neanche alla concentrazione più elevata (**Figura 5, pannello D**).

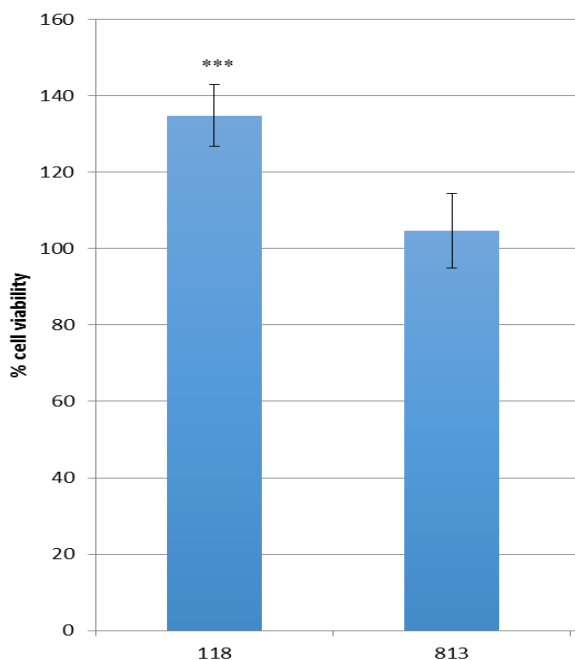




**Figura 5** – Saggio MTT effettuato su differenti linee cellulari tumorali. *Pannello A*: linea cellulare di tumore polmonare H727 trattata con le molecole **107** e **563**; *Pannello B*: linea cellulare di tumore polmonare H727 trattata con nanoparticelle liposomiche e con le molecole **107** e **563**; *Pannello C*: linea cellulare di carcinoma polmonare A549 trattata con le molecole **107** e **563**; *Pannello D*: linea cellulare di carcinoma polmonare A549 trattata con la molecola **452**; *Pannello E*: linea cellulare di tumore mammario MCF-7 trattata con le molecole **107** e **563**; *Pannello F*: linea cellulare di tumore mammario MDA-MB231 trattata con le molecole **107** e **563**; *Pannello G*: linea cellulare di tumore ovarico SKOV3 trattata con le molecole **107** e **563**; *Pannello H*: linea cellulare di glioblastoma U87MG trattata con le molecole **107** e **563**.

Le cellule a semiconfluenza sono state trattate con le molecole **107**, **563** e **452** a differenti concentrazioni (5, 10, 20, 30, 50 uM) per 24 (pannelli A-D e H) o 48 ore (Pannelli E-G). Il controllo corrisponde al 100%. \*\*\*P<0.001; \*\* P<0.01; \* P<0.05

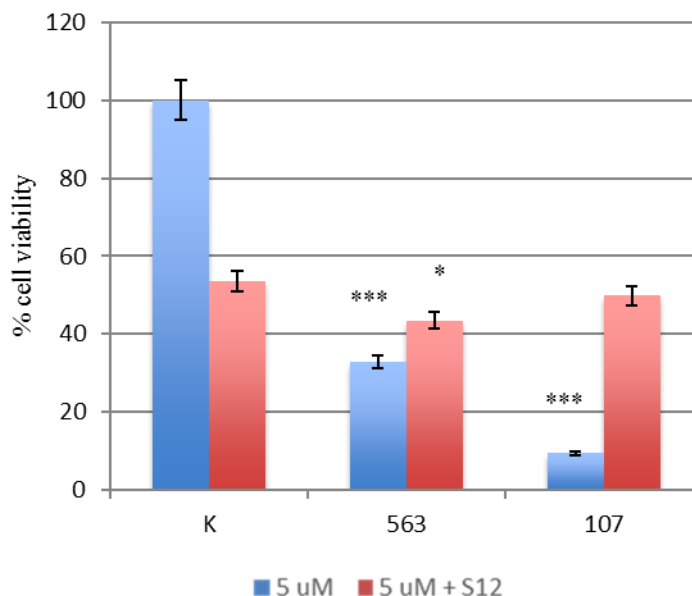
Le molecole **118** e **813**, che rappresentano due frammenti dipirrilici di **107** e **563**, sono risultate anche esse inattive nei confronti delle cellule A549 (**Figura 6**). Questi dati indicano che la porzione calix[4]pirrolica ed il gruppo sostituito meso-acetanilide siano entrambi componenti necessari a garantire le proprietà citotossiche di **107** e **563**.



**Figura 6.** Saggio MTT effettuato su cellule di carcinoma polmonare della linea A549. Le cellule sono state trattate per 24 ore con le molecole **118** e **813** alla concentrazione di 5 uM. Il controllo corrisponde al 100%. \*\*\* P<0.001.

Dal confronto tra i risultati ottenuti con Cristal Violetto (**Figura 4**) e quelli derivanti dai saggi MTT (**Figura 5**) sono state riscontrate alcune differenze. Infatti, nelle cellule A549 la molecola **107** alla concentrazione di 5 uM e dopo 24 ore di trattamento è risultata maggiormente efficace nell'ostacolare la funzione mitocondriale (MTT) più che nel determinare morte cellulare (CV). Questa osservazione è riconducibile al fatto che il danno mitocondriale è un prerequisito per la morte cellulare e solamente una parte delle cellule che presentano alterazioni a livello mitocondriale va incontro ad apoptosi o necrosi.

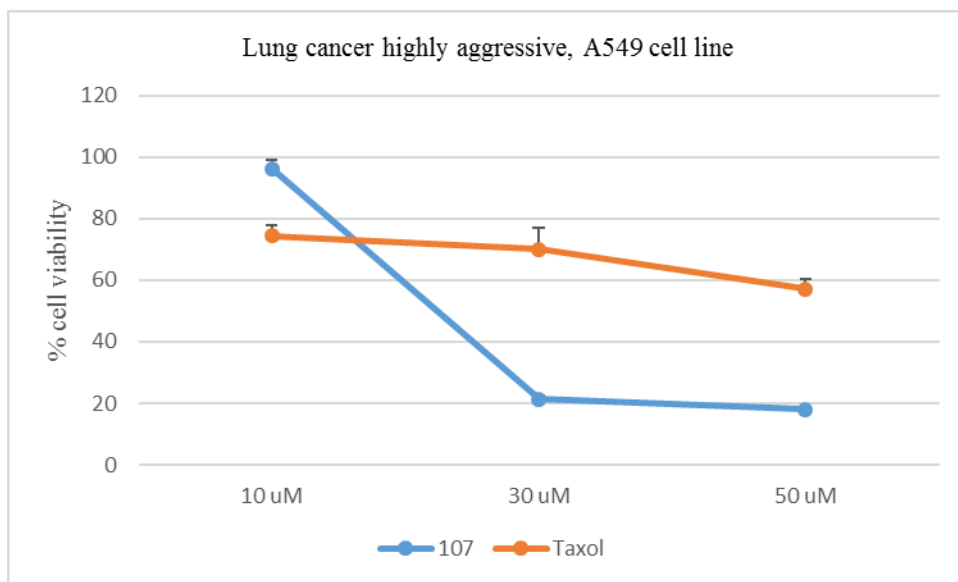
Per fare luce sul metabolismo dei derivati pirrolici, è stata esaminata l'influenza della frazione epatica S12 sull'efficacia delle molecole **107** e **563**. Come mostrato in **Figura 7**, S12 diminuisce notevolmente la capacità del pirrolo **107** di determinare morte nelle cellule A549 (colonne rosse) rispetto a quanto accade in assenza di S12 (colonne blu). Questa osservazione indica che **107** non necessita di attivazione metabolica poiché risulta già di per sé attivo al momento della somministrazione. D'altra parte, la molecola **107** è sottoposta a reazioni metaboliche di Fase II che riguardano la detossificazione ed il catabolismo dei farmaci. Di conseguenza, queste molecole, *in vivo*, non possono essere somministrate per via orale ma per via parenterale, utilizzando iniezioni subcutanee. La somministrazione per via endovenosa non dovrebbe essere effettuata a causa della elevata lipofilità di tali composti che potrebbe determinare rischio di embolia.



**Figura 7** – Saggio MTT effettuato su cellule di carcinoma polmonare della linea A549 trattate con il calixpirrolo **107** in presenza ed in assenza della frazione epatica S12. Tempo di trattamento: 12 ore. \*\*\*  $P < 0.001$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*  $P < 0.05$

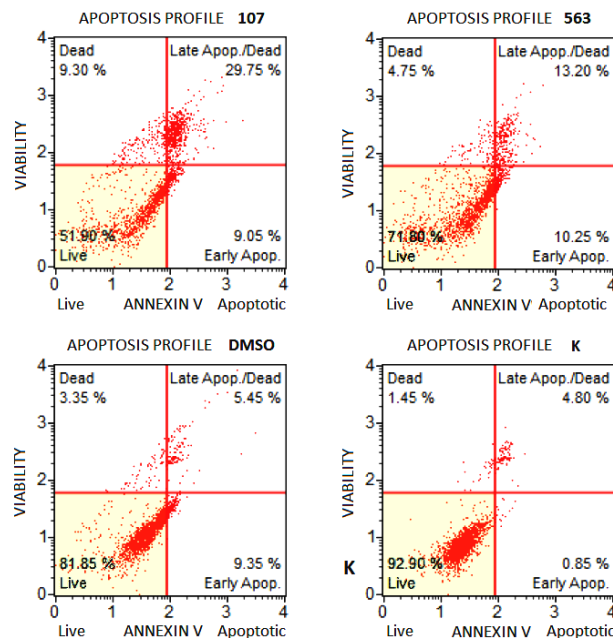
L'efficacia dei macrocicli pirrolici nell'inibire la vitalità delle cellule A549 è stata confrontata con quella del farmaco chemioterapico Tassolo. Le cellule sono state trattate con **107** e Tassolo per 12 ore poiché tale tempo di trattamento viene solitamente applicato per testare farmaci chemioterapici ad elevata citotossicità, come appunto il Tassolo.

I risultati ottenuti evidenziano una maggiore efficacia del composto **107** rispetto al Tassolo utilizzato alle stesse concentrazioni (**Figura 8**).



**Figura 8** - Saggio MTT effettuato su cellule di carcinoma polmonare della linea A549 trattate per 12 ore con il calixpirrolo **107** o con Tassolo. Il controllo corrisponde al 100%.  $P < 0.001$ ;

In seguito alla valutazione delle proprietà citotossiche delle molecole **107** e **563** nei confronti delle linee cellulari tumorali precedentemente menzionate, è stato indagato il meccanismo attraverso il quale si verifica morte cellulare. Tale lavoro è stato limitato alle cellule di carcinoma polmonare A549 poiché questa linea cellulare è risultata quella maggiormente interessata dagli effetti citotossici dei calixpirroli testati. L'analisi citofluorimetrica ha indicato l'apoptosi come meccanismo principale di morte cellulare in seguito al trattamento delle cellule con i calixpirroli **107** e **563**. Infatti, le cellule trattate con il composto **107** mostrano il 38.80% di apoptosi totale (9.05% apoptosi precoce e 29.75% apoptosi tardiva) ed il 9.30% di necrosi. Nella stessa linea cellulare, la molecola **563** determina il 23.45% di apoptosi totale (10.25% di apoptosi precoce e 13.20% di apoptosi tardiva) mentre il 4.75% è rappresentato dalla necrosi (**Figura 9**)

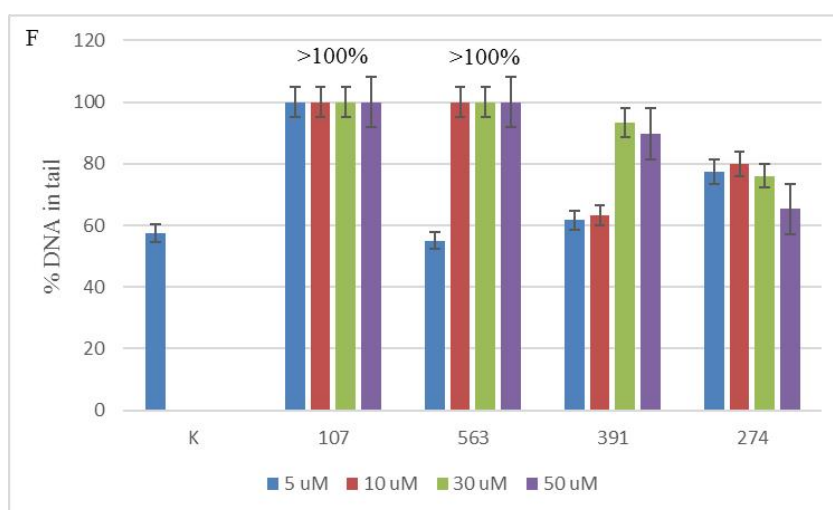
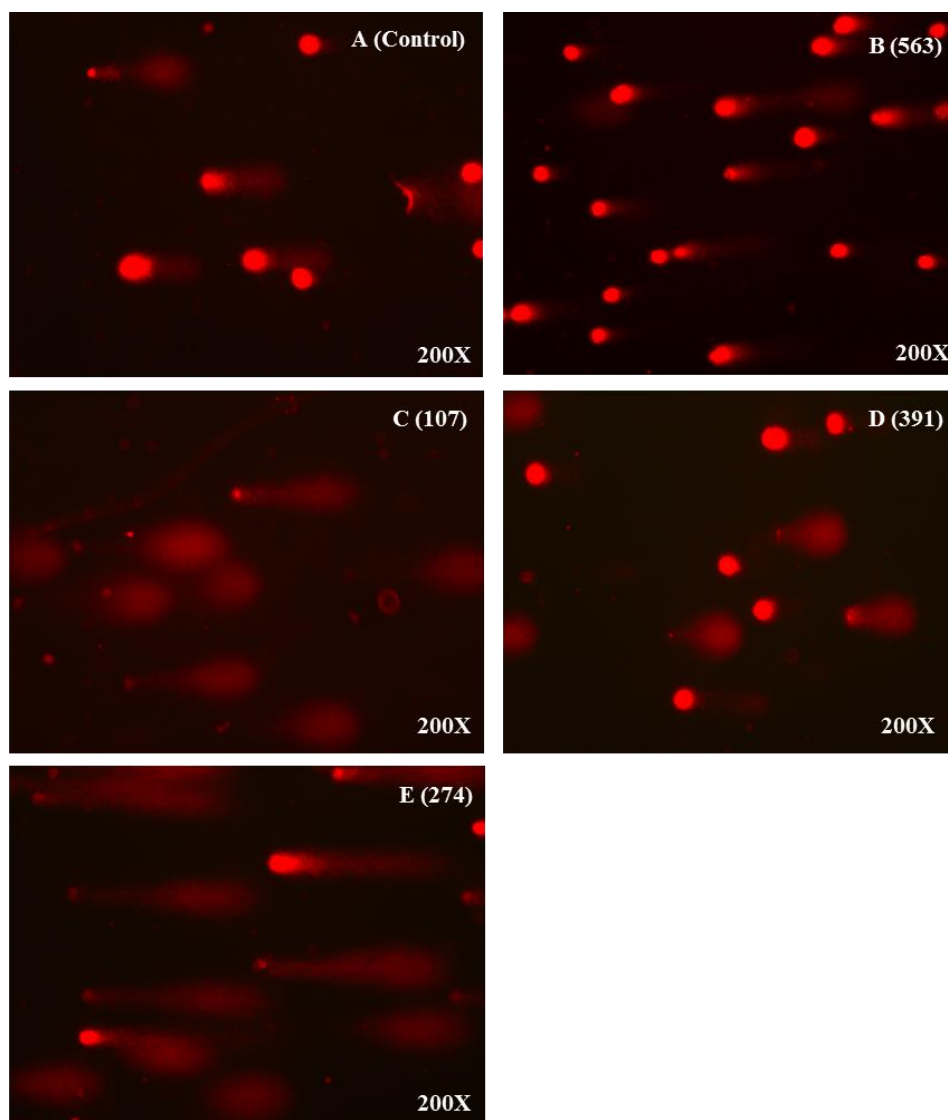


**Figura 9** - Saggio Muse<sup>TM</sup> con Annessina V. In figura sono riportati 4 grafici che rappresentano le diverse condizioni sperimentali (K: controllo; DMSO: cellule trattate con lo 0.5% di DMSO; calixpirrolo **563**: cellule trattate con 5 uM di **563** per 24 ore; calixpirrolo **107**: cellule trattate con 5 uM di **107** per 24 ore).

Ogni grafico è suddiviso in 4 quadranti che riflettono le differenti condizioni cellulari: il quadrante in alto a sinistra contiene le cellule morte per necrosi, quello in alto a destra le cellule che sono andate incontro ad apoptosi tardiva (cellule positive ad Annessina V e al marker di morte cellulare 7-Aminoactinomicina D), il quadrante in basso a sinistra contiene cellule vive e quello in basso a destra le cellule che sono andate incontro ad apoptosi precoce (cellule positive solamente all'Annessina V).

Al fine di valutare la presenza di eventuali danni al DNA, rappresentati da frammentazione, è stato effettuato un Comet Test utilizzando le cellule della linea di carcinoma polmonare A549 trattate per 24 ore con i derivati calixpirrolici **107**, **274**, **391** e **563**. Questa analisi (**Figura 10**) ha evidenziato una frammentazione del DNA in cellule trattate con la molecola **107** che ha la capacità di indurre un ingente danno al DNA a tutte le concentrazioni testate. Considerando il calixpirrolo **563**, la sua efficacia nell'indurre la frammentazione del DNA è particolarmente evidente quando la molecola è utilizzata alle concentrazioni maggiori.

Le cellule trattate con le molecole **274** e **391** presentano una frammentazione del DNA molto minore di quella causata da **107** e **563**.



**Figura 10** – Comet test per la valutazione della frammentazione del DNA attraverso la quantificazione della percentuale di DNA contenuta nelle code dei nuclei delle cellule di carcinoma polmonare della linea A549 in seguito a trattamento alcalino e ad elettroforesi su singola cellula. Le fotografie presenti nella porzione superiore della figura mostrano la distribuzione del DNA nelle code delle comete, in relazione ai vari trattamenti effettuati (A: controllo; B: **563**, 5  $\mu$ M; C: **107**, 5  $\mu$ M; D: **391**, 5  $\mu$ M; E: **274**, 5  $\mu$ M).

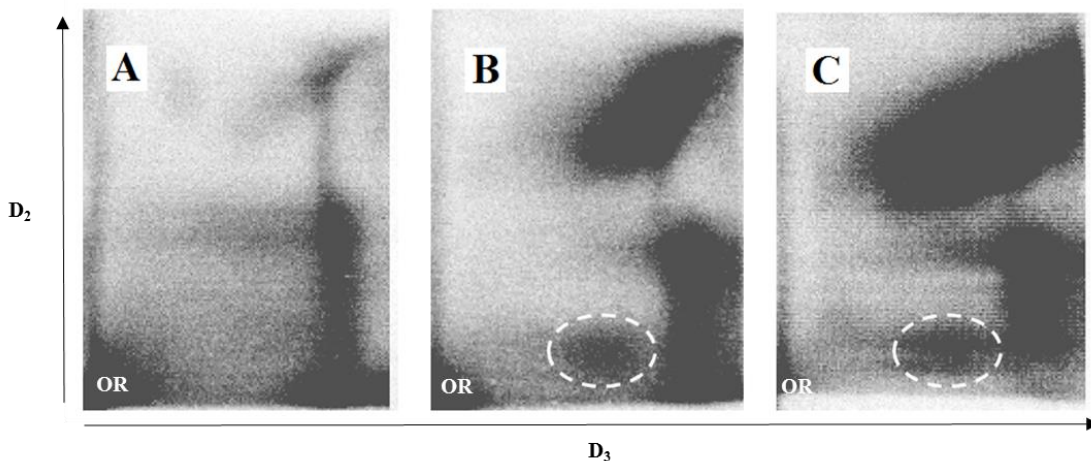
Il pannello F riporta la percentuale di DNA frammentato (% DNA in tail) in ogni condizione sperimentale testata. I risultati sottolineano la capacità dei calixpirroli **107** e **563** di indurre la frammentazione del DNA.

La capacità dei derivati pirrolici **107** e **563** di legare il DNA formando addotti è stata determinata mediante postlabelling con  $^{32}\text{P}$  [17] (**Figura 11**).

Il DNA viene depolimerizzato in singoli nucleotidi, gli addotti vengono estratti attraverso lavaggi con butanolo saturato con acqua e marcati con  $^{32}\text{P}$  utilizzando AT-gamma- $^{32}\text{P}$  come donatore e T4 nucleotide chinasi. Gli addotti marcati con  $^{32}\text{P}$  vengono separati tramite cromatografia multidirezionale su strato sottile effettuata su fogli di cellulosa rivestiti di polietilenimina utilizzando buffer a base di sodio fosfato ed urea. L'identificazione degli addotti avviene tramite autoradiografia elettronica secondo quanto riportato da Izzotti *et al.* [31] [32].

L'analisi comparativa del pattern di addotti al DNA tra controlli e cellule trattate con i composti pirrolici **107** e **563** ha mostrato la formazione di specifici addotti al DNA solamente nelle cellule sottoposte a trattamento con le molecole pirroliche. Tali addotti sono cerchiati in bianco in Figura 11. Essi sono caratterizzati da una scarsa capacità di migrare durante la cromatografia, fatto che indica che si tratta di addotti formati dal legame al DNA di una struttura molecolare ingombrante, riconducibile quindi al legame dei calixpirroli. Inoltre, l'arricchimento in butanolo effettuato durante la fase di estrazione li identifica come addotti altamente lipofili, una caratteristica concorde con la lipofilità delle molecole pirroliche testate. La capacità dei calixpirroli di formare addotti al DNA rilevata con il postlabelling è stata confermata dall'analisi bioinformatica che ha permesso di ricostruire la possibile struttura molecolare degli addotti al DNA osservati.





**Figura 11** – Rilevamento della presenza di addotti al DNA in cellule di carcinoma polmonare della linea A549 controllo (*Lastra A*), trattate con il calixpirrolo **107** (*Lastra B*) o con il **563** (*Lastra C*). Gli addotti sono stati marcati con  $^{32}\text{P}$  e purificati tramite cromatografia multidirezionale su strato sottile la cui origine è situata nell'angolo in basso a sinistra. Gli addotti (cerchiati in bianco) sono identificati come spot radioattivi (neri) tramite autoradiografia elettronica con fosforo imager.

OR, origine della cromatografia su strato sottile;

D2, direzione del secondo sviluppo della cromatografia (urea buffer pH= 3.5);

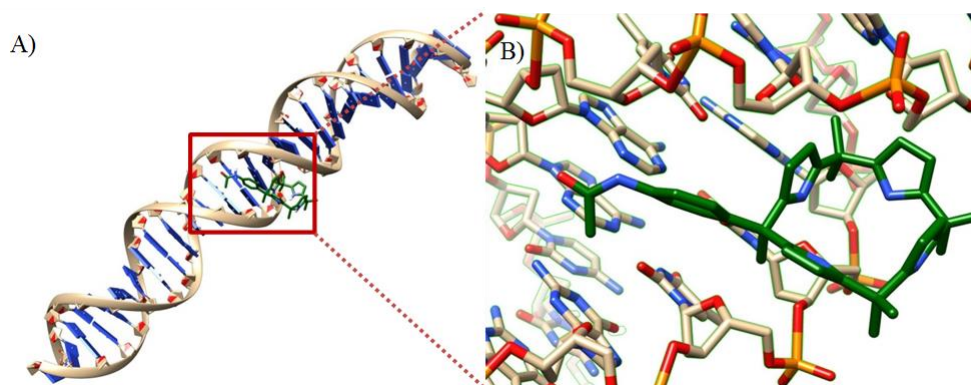
D3, direzione del terzo sviluppo della cromatografia (urea buffer pH= 8.5);

D1 and D4 sono gli sviluppi nei washing buffer di sodio fosfato. La direzione di sviluppo D1 è opposta a D2. La direzione di sviluppo D4 è la stessa di D3. La striscia nera e le aree sulla destra corrispondono al bordo finale della cromatografia.

La capacità dei derivati calixpirrolici di legare gruppi fosfato attraverso legami idrogeno multipli, anche quando tali gruppi si trovano all'interno di nucleotidi, è ben documentata per un certo numero di analoghi di **107** e di **563** <sup>[20]</sup>. Tuttavia, gli addotti al DNA osservati in questo lavoro sono covalenti. La formazione di tali legami potrebbe essere assistita e/o promossa dal legame iniziale della porzione di calix al fosfato del DNA, portando in stretta prossimità le nucleobasi e l'unità acetamidica del calix (o un suo metabolita attivo). Infatti, l'ammina aromatica e molti dei suoi derivati sono noti per la loro capacità di formare legami covalenti con le basi del DNA <sup>[21]</sup>. Esperimenti di docking *in silico* <sup>[28]</sup> indicavano che **107** avesse la potenzialità di intercalare il solco maggiore del DNA posizionando l'ammide molto vicino ad un atomo di azoto adeninico (3.7Å).

La simulazione effettuata nel presente lavoro utilizzando il software Autodock ha dimostrato che **107** intercala il DNA con il suo scheletro calix[4]pirrolico e con la sua catena laterale acetilata punta dritto verso due nucleobasi adeniniche consecutive. La porzione acetilata di **107** viene così

a trovarsi particolarmente vicina all'atomo di azoto di una di queste adenine (**Figura 12**). Il particolare ambiente presente nel nucleo della cellula e la pKa delle basi azotate, in particolare quella di adenina e timina, consentono di ipotizzare che la parte acetilata della catena laterale di **107** sia trasferita dal calixpirrolo all'azoto di tale nucleobase. Il DNA acetilato così formato condurrebbe a morte cellulare durante i successivi processi di replicazione.



**Figura 12** – Modello di legame del calixpirrolo **107** al DNA ottenuto tramite simulazione molecolare *in silico*. *Pannello A*: localizzazione del sito di legame di **107** (disegnato in verde) all'interno del filamento di DNA. La porzione contornata dal quadrato in rosso è riportata nel *Pannello B*, dove sono visibili due nucleobasi adeniniche situate in prossimità del gruppo acetile del calixpirrolo.

Oltre a considerare l'interazione con il DNA, il presente lavoro si è proposto di valutare gli effetti epigenetici determinati dall'azione dei derivati calixpirrolici tramite analisi dei microRNA. Tale analisi ha rilevato che il trattamento delle cellule A549 con **107** modifica notevolmente l'espressione dei microRNA (**Figura 13**). Infatti, gli scatter plots sottolineano come numerosi microRNA cambino i loro livelli di espressione di oltre due volte nelle cellule trattate (asse verticale) rispetto ai controlli (asse orizzontale), come indicato dai numerosi dots posizionati all'esterno dell'intervallo di variazione rappresentato dalle linee verdi diagonali.

L'analisi Volcano plot, che considera due criteri di selezione (fold variation maggiore di due e variazione della significatività statistica  $P < 0.05$ ) ha identificato 38 microRNA la cui espressione

risulta alterata da **107**. Questi microRNA sono implicati in numerose funzioni biologiche, come mostrato in **Tabella 2**. Tali osservazioni spiegano a livello epigenetico l'attivazione dei pathways di apoptosi e necrosi derivanti da elevati livelli di danno al DNA indotti da **107** sulle cellule A549.

**Tabella 2.** Funzioni biologiche dei microRNA.

MicroRNA	Fold variation	Descrizione	Bibliografia
hsa-miR-7-2-3p	3.48	Regolazione di c-Fos	[33]
hsa-let-7b-3p/ mmu-let-7b-3p/ rno-let-7b-3p	3.47	Inibizione della proliferazione cellulare, soppressione dell'oncogene (RAS)	[34]
hsa-let-7f-1-3p/ mmu-let-7f-1-3p/ rno-let-7f-1-3p	3.11	Regolazione di High Mobility Group Box 1 (HMGB1) (autofagia)	[35]
hsa-miR-26a-2-3p	2.64	Inibizione dell'espressione di TGF	[36]
hsa-miR-26b-3p/ mmu-miR-26b-3p/ rno-miR-26b-3p	2.73	Regolazione della proliferazione delle cellule staminali mesenchimali derivate da cordone ombelicale umano agendo sul recettore degli estrogeni.	[37]
hsa-miR-30b-5p/ mmu-miR-30b-5p/ rno-miR-30b-5p	3.98	Risposta da stress (attivazione di NF-kappaB), riparazione di proteine, inibizione del ciclo cellulare, attivazione dell'oncogene EGF	[34]
hsa-miR-30c-5p/ mmu-miR-30c-5p/ rno-miR-30c-5p	2.87	Azione su acido grasso sintasi; inibitore del recettore degli androgeni	[38] [39]
hsa-miR-34b-3p	3.92	Effettore di P53	[34]
hsa-miR-129-1-3p/ mmu-miR-129-1-3p	4.29	Transizione EMT, crescita cellulare	[40]

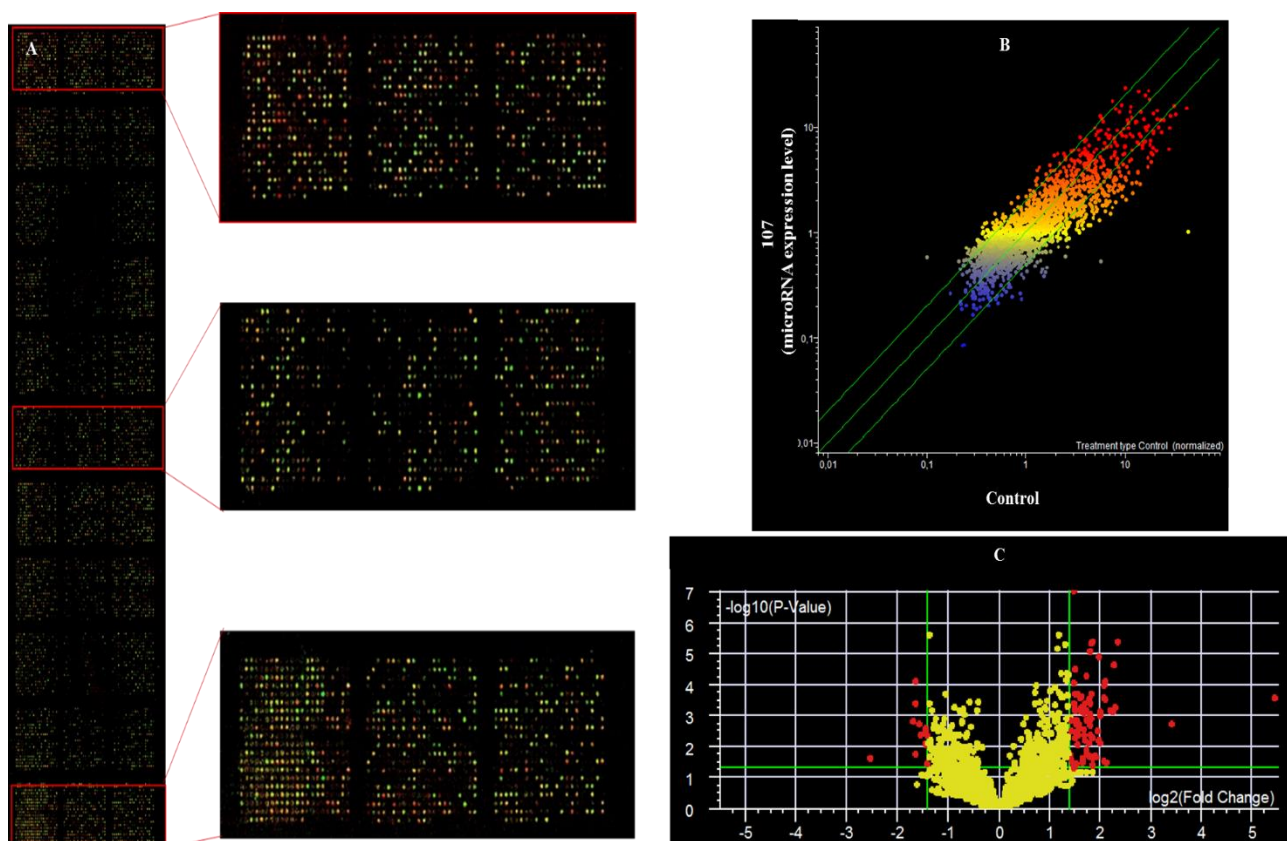
			[41]
hsa-miR-130b-5p/ mmu-miR-130b-5p/ rno-miR-130b-5p	2.77	Proliferaazione cellulare	[42]
hsa-miR-142-5p/ mmu-miR-142-5p/ rno-miR-142-5p	3.30	Inibitore della crescita di cellule cancerose	[43]
hsa-miR-150-5p/ mmu-miR-150-5p/ rno-miR-150-5p	2.96	Promozione della proliferazione e della migrazione cellulare attraverso la regolazione del fattore di trascrizione Sp1	[44]
hsa-miR-196a-3p/ mmu-miR-196a-2-3p/ rno-miR-196a-3p	3.61	Regolazione del fattore di crescita dei fibroblasti (FGF2)	[45]
hsa-miR-197-3p	4.16	Apoptosi, proliferazione cellulare	[34]
hsa-miR-203b-5p/ rno-miR-203b-5p	3.40	Regolazione dell'espressione del gene MyoD; oncosoppressore	[46] [47]
hsa-miR-204-5p/ mmu-miR-204-5p/ rno-miR-204-5p	3.01	Oncosoppressore; proliferazione cellulare	[48] [49]
hsa-miR-296-5p/ mmu-miR-296-5p/ rno-miR-296-5p	0.17	Regolazione della Caspasi- 8 (CASP8) e del recettore di crescita neuronale (NGFR); soppressore della vitalità cellulare attraverso la regolazione di Polo-like kinase 1 (PLK1); oncosoppressore che agisce su Peptidil-prolil cis-trans isomerasi (pin 1)	[50] [51] [52]
hsa-miR-361-3p/ mmu-miR-361-3p/ rno-miR-361-3p	3.52	Transizione EMT; proliferazione cellulare	[53] [54]

hsa-miR-372	0.34	Inibizione della migrazione e dell'invasione cellulare tramite azione su p65 in tumore prostatico	[73]
hsa-miR-374c-5p	3.79	ND	
hsa-miR-377-3p/ mmu-miR-377-3p	2.97	Oncosoppressore	[55]
hsa-miR-449b-3p	2.99	Sviluppo della corteccia cerebrale nei mammiferi; Proliferazione cellulare	[56] [57]
hsa-miR-545-5p	3.32	Proliferazione cellulare	[58]
hsa-miR-548aa/ hsa-miR-548ap-3p/ hsa-miR-548t-3p	3.50	Regolatore antioncogeno	[59]
hsa-miR-548as-3p	2.81	Regolatore antioncogeno	[59]
hsa-miR-559	2.76	Regolazione di ERBB2	[60]
hsa-miR-576-5p	2.87	Regolazione di ITGBL1 (integrin subunit beta like 1, membro della famiglia delle proteine EGF-simili)	[61]
hsa-miR-652-3p/ mmu-miR-652-3p /rno-miR-652-3p	0.32	Proliferazione e promozione di metastasi tramite azione su Lgl1 (Leucine-rich, glioma inactivated 1) in lung cancer	[62]
hsa-miR-656	4.22	Proliferazione cellulare, migrazione ed invasione	[63]
hsa-miR-659-3p	0.31	Regolazione di Sphingosine kinase 1 (SPHK1) e implicazione nella chemioresistenza del cancro del colon-retto; deregolazione del focal adhesion pathway nel neuroblastoma; regolazione	[64] [65] [66]

		del gene della progranulina (GNR, crescita cellulare e regolazione della progressione del ciclo cellulare)	
		Regolazione di JNK2 (protein chinasi della famiglia delle MAPK);	[67]
hsa-miR-659-5p	3.52	regolazione di GRN (progranulina);	[68]
		differenziamento in senso miogenico	[69]
hsa-miR-660-3p	3.25	Inibitore del tumore polmonare attraverso l'azione sul pathway di P53	[70]
hsa-miR-676-5p	3.61	ND	-
		Differenziamento in miofibroblasti delle cellule	[71]
hsa-miR-877-3p	3.72	staminali mesenchimali residenti nel polmone; produzione di IL-8 e IL-1 $\beta$ nelle cellule mesangiali	[72]

---

ND, non disponibile.



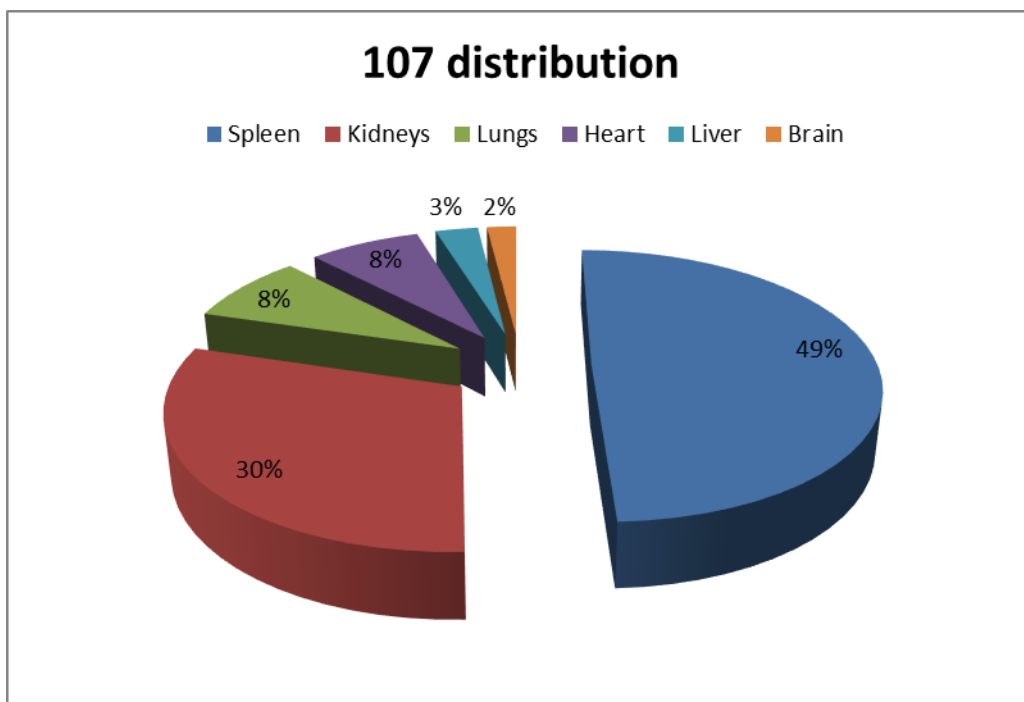
**Figura 13** - Valutazione dell'espressione dei microRNA tramite analisi Microarray in cellule A549 controllo e trattate con **107**. Pannello A: vetrino per Microarray che mostra come spot fluorescenti i microRNA che si sono legati alle sonde presenti sul vetrino stesso. Il numero di spot fluorescenti risulta maggiore del 90% indicando una buona qualità di analisi. Pannello B: analisi scatter plot che compara il livello di espressione di ciascuno dei 1350 microRNA analizzati nei controlli (asse orizzontale) con quelli analizzati nelle cellule trattate con **107** (asse verticale). Gli spot situati all'esterno dell'intervallo di variazione di 1.5 (linee verdi diagonali) rappresentano i microRNA up-regolati (area in alto a sinistra) o down-regolati (area in basso a destra) dall'azione di **107**.

Pannello C: analisi Volcano plot dei microRNA modulati da **107** confrontati con i controlli. I microRNA sono raffigurati come spot posizionati all'interno del grafico a seconda delle differenze di fold-variation (asse orizzontale,  $> 1.5$ , indicata dalle due linee verdi verticali) e della significatività statistica di tali variazioni calcolata con ANOVA (asse verticale,  $P \text{ value} < 0.05$  in scala logaritmica, indicata dalle linee verdi orizzontali). I microRNA localizzati al di fuori delle linee verdi (fold variation  $> 1.5$  e  $P < 0.05$ , spot rossi) sono quelli che vengono modulati in modo significativo da **107**.

### 3.2. Valutazione *in vivo* della farmacocinetica e della distribuzione organospecifica dei derivati calixpirrolici

Un'analisi preliminare per la valutazione della tossicità *in vivo* è stata effettuata su topi A/J utilizzando solamente la molecola **107**. Dal momento che questo calixpirrolo risulta dotato di una natura particolarmente idrofobica, dopo numerosi tentativi, è stato scelto come solvente per la somministrazione della molecola nell'animale una miscela contenente il 10% di DMSO in olio di oliva. Simulazioni computazionali hanno indicato una dose orale letale (LD50) di 920 mg/Kg. Al fine di determinare sperimentalmente nel topo la LD50, è stata iniettata sottocute una prima dose di 5 mg/Kg, aumentata poi fino a 50 volte, senza riscontrare effetti particolari nell'animale, in accordo con quanto determinato mediante simulazione computazionale. Infine, è stata modificata la via di somministrazione da sottocutanea a intraperitoneale senza osservare alcuna variazione evidente. Dopo 5 giorni dall'iniezione, l'animale è stato sacrificato ed è stata determinata la distribuzione del composto **107** all'interno dei diversi organi (**Figura 14**) attraverso un'analisi HPLC/massa. I diversi organi e tessuti (tessuto sottocutaneo dorsale, milza, omento, cuore, fegato, cervello, polmone e rene) sono stati prelevati ed omogenati. Un'elevata concentrazione di **107** è stata osservata a livello del sito di iniezione (Area 532,875) e della milza (Area 196,233) ma la maggiore quantità di **107**, come previsto, è stata rinvenuta nell'omento (Area 1,237,999) e nei reni (Area 120,117). Concentrazioni minori della molecola sono state riscontrate nei polmoni (Area 32,514) e nel cuore (Area 29,443). Una quantità minima era presente nel fegato (Area 11,923) ed infine nel cervello (Area 7,735) indicando che un calixpirrolo, nonostante la sua relativa “grossa taglia” è effettivamente in grado di superare la barriera emato-encefalica.





**Figura 14.** Distribuzione del calixpirrolo **107** all'interno dei diversi organi murini.

#### 4. Discussione

Analisi preliminari condotte su diversi derivati del calix[4]pirrolo indicano che questo scaffold risulta potenzialmente di grande interesse nel processo di drug discovery. Infatti, le caratteristiche chimiche conferiscono a questa classe di macrocicli la capacità di bypassare rapidamente le membrane biologiche e raggiungere facilmente il nucleo cellulare. Tra i composti recentemente testati, due sembrano avere un potenziale utilizzo nei confronti del cancro polmonare ed ovarico, precisamente **107** e **563**. In particolare, il composto **107** ha mostrato un EC<sub>50</sub> <5 uM quando testato su cellule di carcinoma polmonare della linea A549 mentre **563** un EC<sub>50</sub> ~ 10uM nei confronti della linea cellulare tumorale ovarica SKOV3. La selettività di questi composti è stata confermata dai test MTT effettuati su diverse linee cellulari di tumore mammario e cerebrale, non dimostrando alcuna attività significativa. In seguito ad esposizione ai due derivati macrociclici, le linee cellulari tumorali muoiono per apoptosi dopo 24-48 ore, come dimostrato dall'analisi di time-course e dal saggio con Annessina V. Per entrambi i derivati calixpirrolici **107** e **563** sono stati rilevati addotti al DNA che dimostrano la formazione di un legame covalente tra l'acido nucleico e le molecole testate. Una simulazione di docking molecolare *in silico* ha mostrato come **107** intercali l'elica del DNA con il suo scheletro calix[4]pirrolico e con la sua catena laterale acetilata che punta verso due nucleobasi adeniniche consecutive. La porzione acetilata di **107** sarebbe quindi molto vicina all'atomo di azoto di una di queste due adenine. Il particolare ambiente presente nel nucleo e la pKa delle basi azotate, in particolare quella di adenina e timina, portano ad ipotizzare che la frazione acetilata della molecola sia trasferita dal calixpirrolo all'azoto (N<sub>3</sub>) di questa nucleobase. Il DNA acetilato condurrebbe poi ad apoptosi durante i processi di replicazione cellulare. Proprio questa azione diretta dei calixpirroli testati nei confronti del DNA rappresenta un risultato interessante. Infatti, utilizzando diversi derivati calixpirrolici, era stato precedentemente accertato che queste molecole macrocicliche potessero agire solamente come “vettori molecolari” e che fossero in grado di indurre apoptosi favorendo l'ingresso di ioni cloro all'interno delle cellule <sup>[17]</sup> <sup>[18]</sup>. Al contrario, i risultati ottenuti nel presente lavoro, indicando la presenza di un'azione diretta della molecola **107** sul DNA, suggeriscono che, almeno per i derivati calixpirrolici testati, il cloro non sia implicato nel meccanismo di morte cellulare per apoptosi. A differenza del precedente lavoro di Cafeo *et. al.* <sup>[16]</sup> relativo al trasporto del Trans-Platino (trans-Pt(II)) al DNA per mezzo di un

complesso nel quale il calixpirrolo **274** agiva come vettore, nel presente lavoro la citotossicità è dovuta alla molecola **107** come tale. Le proprietà biologiche sono specificamente associate alle caratteristiche strutturali di **107**, compresi i diversi gruppi funzionali e la loro disposizione all'interno della molecola.

I test preliminari effettuati *in vivo* su topi A/J non hanno mostrato tossicità per quanto riguarda **107** anche a dosi elevate (fino a 228 mg/Kg). L'analisi HPLC/massa, effettuata al fine di identificare la distribuzione della molecola **107** all'interno di organi e tessuti dell'animale, ha rivelato una elevata concentrazione di tale calixpirrolo a livello dell'omento, una concentrazione minore in reni, polmoni e cuore ed infine una piccola quantità è stata riscontrata a livello cerebrale. Questa analisi preliminare suggerisce che il calixpirrolo **107** non sia tossico per il topo e che sia in grado di superare la barriera emato-encefalica, nonostante le dimensioni della molecola risultino relativamente elevate. Quest'ultimo risultato appare particolarmente interessante poiché, per quanto riguarda ad esempio il tumore al polmone, il cervello rappresenta uno dei più frequenti organi bersaglio di metastasi e, ad oggi, sono pochi i farmaci in grado di raggiungere questo organo. Inoltre, nel caso di pazienti con tumore polmonare non a piccole cellule precedentemente trattati con terapia chirurgica, i derivati calixpirrolici potrebbero rappresentare in futuro una valida alternativa ai chemioterapici attualmente in uso nell'ambito della prevenzione terziaria, riducendo l'insorgenza di recidive.

Poiché i meccanismi di azione precisi di **107** e **563** rimangono da investigare, l'ipotesi formulata è che la mancanza di attività riscontrata nel composto **452** potrebbe essere dovuta all'ingombro sterico di due unità para-acetammidiche che ne impediscono l'inserimento nel solco maggiore del DNA, fenomeno che si ritiene accada nel caso del derivato **107**. Tuttavia, vi sono altre ragioni che potrebbero entrare in gioco. Se l'attivazione enzimatica risultasse necessaria per l'attività, **452** potrebbe essere resistente a questo passaggio. E' stata inoltre considerata la capacità di questi derivati calixpirrolici di legare ioni  $\text{Cl}^-$ , in considerazione dei recenti studi sull'attività citotossica di cloruri e trasportatori <sup>[17]</sup> <sup>[18]</sup>. In esperimenti di binding competitivo (titolazione  $^1\text{H-NMR}$  in acetonitrile) **452** è risultato essere solo marginalmente meno efficace di **107** come ligando del cloruro. D'altra parte, la formazione di addotti al DNA osservati presuppone un meccanismo d'azione diverso da quello delucidato precedentemente <sup>[74]</sup> in cui le piccole molecole di calixpirrolo fungevano da trasportatori di ioni  $\text{Cl}^-$  innescando l'apoptosi. Nello specifico, il legame covalente tra la molecola di calixpirrolo e il DNA sembrerebbe illustrare l'avvio del processo apoptotico come dimostrato dall'analisi citofluorimetrica.

## 5. Conclusioni

I derivati calixpirrolici **107** e **563** hanno mostrato un'elevata citotossicità nei confronti di linee cellulari derivanti da neoplasie polmonari ed ovariche. Una minore efficacia di tali molecole è stata invece riscontrata per quanto riguarda le linee cellulari tumorali cerebrali e mammarie. In particolare, i risultati dei test condotti *in vitro* sulla linea cellulare A549, derivante da un carcinoma polmonare espantato da un uomo caucasico di 58 anni, evidenziano che le molecole **107** e **563** sono in grado di intercalare il DNA, prerequisito essenziale per l'induzione delle cellule al processo di apoptosi. Inoltre, l'interfaccia farmaco-ambiente cellulare determina modifiche epigenetiche come evidenziato dall'analisi di espressione dei microRNA, rilevata tramite tecnica dei microarray. Queste evidenze sperimentali gettano luce su nuove proprietà farmacologiche di queste molecole pirroliche, ad oggi considerate responsabili dell'induzione di morte cellulare esclusivamente grazie alla loro capacità di trasportare ioni  $\text{Cl}^-$  all'interno delle cellule <sup>[17]</sup>. Il presente lavoro, documentando l'azione diretta del calixpirrolo **107** sul DNA, evidenzia invece la capacità di queste molecole di agire esse stesse come farmaci e non solamente come carriers di altre specie molecolari.

Inoltre, come dimostrato dallo studio preliminare *in vivo* condotto su un modello sperimentale murino, il calixpirrolo **107** è in grado di superare la barriera ematoencefalica senza determinare evidenti effetti tossici sull'animale. Questo risultato riveste un ruolo importante per quanto riguarda la prevenzione terziaria dei tumori polmonari. Infatti, l'approccio chirurgico usato in prima istanza di per sé non risulta risolutivo nel 33% dei pazienti. Infatti, circa 1/3 dei pazienti recidiva in situ o in altri organi come il cervello o le ossa. Ad oggi, la gestione dei tumori che coinvolgono il cervello risulta particolarmente difficoltosa a causa del fatto che sono molto limitati i farmaci in grado di superare la barriera ematoencefalica. Le caratteristiche chimico-fisiche dei derivati calixpirrolici rendono queste molecole altamente lipofile, prerequisito necessario all'attraversamento della barriera ematoencefalica.

Alla luce dei risultati ottenuti nel presente lavoro, risulta evidente la necessità di condurre ulteriori studi sui derivati calixpirrolici intesi non più come carriers di specie ioniche ma come molecole di per sé farmacologicamente attive, capaci di stabilire legami covalenti con il DNA. In quest'ottica, il calixpirrolo **107** potrebbe rappresentare il precursore di nuove molecole

antitumorali biologicamente attive da poter impiegare nella prevenzione delle recidive o come terapia di seconda linea in soggetti affetti da neoplasie.

## 6. Bibliografia

- [1] International Agency of Cancer research (IARC), GLOBOCAN 2012.
- [2] Associazione Italiana Ricerca sul cancro (AIRC), [www.airc.it](http://www.airc.it).
- [3] American Cancer Society, [www.cancer.org](http://www.cancer.org)
- [4] IARC, Pathology and genetics of the tumors of the lung, pleura, thymus and heart, 2004.
- [5] Hess et al., 2006
- [6] Kelley MJ, McCrory DC. Prevention of lung cancer: summary of published evidence. *Chest*. 2003 Jan;123(1 Suppl):50S-59S.
- [7] Peto R, Darby S, Deo H, Silcocks P, Whitley E, Doll R. Smoking, smoking cessation, and lung cancer in the UK since 1950: combination of national statistics with two case-control studies. *BMJ*. 2000 Aug 5;321(7257):323-9.
- [8] Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clin Chest Med*. 2011 Dec;32(4):605-44].
- [9] Istituto Nazionale Tumori Milano, <http://www.istitutotumori.mi.it>
- [10] Gale PA, Anzenbacher P, Sessler JL., Calixpyrroles II, *Coord. Chem. Rev.* 2001, 222, 57-102.
- [11] Baeyer A, Ueber ein Condensationsproduct von Pyrrol mit Aceton. *Ber. Disczt. Chem. Ger.* 1886, 19, 2184-2185.
- [12] Allen WE, Gale PA, Brown CT, Lynch VM, Sessler J L, Binding of Neutral Substrates by Calix[4]pyrroles *J. Am. Chem. Soc.* 1996, **118**, 12471-12472.
- [13] Gale PA, Sessler J L, Král V, Calixpyrroles. *Chem. Commun.* 1998; 1-8.
- [14] Sessler JL, Gale PA, Genge JW. Calix[4]pyrroles: New Solid-Phase HPLC Supports for the Separation of Anions *Chem.-Eur.J.* 1998, 4, 1095-1099.
- [15] de Namor AF, Hakawati NA, Hamdan WA, Soualhi R, Korfali S, Valiente L. Calix[4]pyrrole for the removal of arsenic (III) and arsenic (V) from water. *J Hazard Mater.* 2017 Mar 15;326:61-68.
- [16] Cafeo G, Carbotti G, Cuzzola A, Fabbi M, Ferrini S, Kohnke FH, Papanikolaou G, Plutino MR, Rosano C, White AJP, Drug delivery with a calixpyrrole--trans-Pt(II) complex. *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 2544-2551.

- [17] Ko SK, Kim SK, Share A, Lynch VM, Park J, Namkung W, Van, RW, Busschaert N, Gale PA, Sessler JL, Shin I, Synthetic ion transporters can induce apoptosis by facilitating chloride anion transport into cells *Nat. Chem.* 2014, 6, 885-892.
- [18] Busschaert N, Park SH, Baek KH, Choi Y P, Park J, Howe ENW, Hiscock JR, Karagiannidis LE, Marques I, Félix V, Namkung W, Sessler JL, Gale PA, Shin I, A synthetic ion transporter that disrupts autophagy and induces apoptosis by perturbing cellular chloride concentrations *Nat. Chem.* 2017, 9, 667-675.
- [19] Cafeo G, Gattuso G, Kohnke FH, Papanikolaou G, Profumo A, Rosano C, Host-guest chemistry of aromatic-amide-linked bis- and tris-calix[4]pyrroles with bis-carboxylates and citrate anion *Chem. Eur. J.* 2014, 20, 1658-1668.
- [20] Cafeo G, Kohnke FH, Mezzatesta G, Profumo A, Rosano C, Villari A, White AJP, Host-guest chemistry of a bis-calix[4]pyrrole derivative containing a trans/cis-switchable azobenzene unit with several aliphatic bis-carboxylates . *Chem. Eur. J.* 2015, 21, 5323-5327.
- [21] Lappano R, Pisano A, Santolla MF, De FEM, De MP, Dolce V, Maggiolini M, Rosano C, Ponassi M, Felli L, Cafeo G, Kohnke FH, Abonante S, A calixpyrrole derivative acts as an antagonist to GPER, a G-protein coupled receptor: mechanisms and models. *Dis Model Mech* 2015, 8, 1237-1246.
- [22] Armarego WLF, Chai L, Purification of laborator chemicals, 6th edition Butterworth-Heinemann, 2009.
- [23] Pulliero A, Wu Y, Fenoglio D, Parodi A., Romani M, Soares CP, Filaci G, Lee JL, Sinkam PN, Izzotti A, *Carcinogenesis*, 2015, 36, 368-377.
- [24] Camoirano A, Balansky RM, Bennicelli C, Izzotti A, D'Agostini F, De Flora S. Experimental databases on inhibition of the bacterial mutagenicity of 4-nitroquinoline 1-oxide and cigarette smoke. *Mutat Res.* 1994;317(2):89-109.
- [25] Visalli G, Baluce B, La Maestra S, Micale RT, Cingano L, De Flora S, Di Pietro A. Genotoxic damage in the oral mucosa cells of subjects carrying restorative dental fillings. *Arch Toxicol.* 2013 Jan;87(1):179-87.
- [26] Izzotti A, Camoirano A, D'Agostini F, Sciacca S, De Naro Papa F, Cesarone CF, De Flora S. Biomarker alterations produced in rat lung by intratracheal instillations of air particulate extracts and chemoprevention with oral N-acetylcysteine. *Cancer Res.* 1996 1;56(7):1533-8.

- [27] Menini M, Dellepiane E, Baldi D, Longobardi MG, Pera P, Izzotti A. Microarray expression in peri-implant tissue next to different titanium implant surfaces predicts clinical outcomes: a split-mouth study. *Clin Oral Implants Res* 2017;28(9):e121-e134.
- [28] Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ. Auto-dock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Computational Chemistry*, 2009,16: 2785-91.
- [29] Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. UCSF Chimera – A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 2004, 25:1605-1612.
- [30] Vecchio D, Daga A, Carra E, Marubbi D, Raso A, Mascelli S, Nozza P, Garrè ML, Pitto F, Ravetti JL, Vagge S, Corvò R, Profumo A, Baio G, Marcello D, Frosina G, Pharmacokinetics, pharmacodynamics and efficacy on pediatric tumors of the glioma radiosensitizer KU60019 *International Journal of Cancer*, 2015, 136, 1445-1457.
- [31] Izzotti A. (1998) Detection of modified DNA nucleotides by postlabeling procedures. *Toxicol Meth.*; 8: 175-205.
- [32] Izzotti A, Camoirano A, Cartiglia C, Grubbs CJ, Lubet RA, Kelloff GJ, De Flora S. Patterns of DNA adduct formation in liver and mammary epithelial cells of rats treated with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene, and selective effects of chemopreventive agents. *Cancer Res.* 1999 Sep 1;59(17):4285-90.
- [33] Zhao XD, Lu YY, Guo H, Xie HH, He LJ, Shen GF, Zhou JF, Li T, Hu SJ, Zhou L, Han YN, Liang SL, Wang X, Wu KC, Shi YQ, Nie YZ, Fan DM. MicroRNA-7/NF- $\kappa$ B signaling regulatory feedback circuit regulates gastric carcinogenesis. *J Cell Biol.* 2015 Aug 17; 210(4):613-27.
- [34] Izzotti A., Cartiglia C., Steele V., De Flora S. MicroRNAs as targets for dietary and pharmacological inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res. Rev.* 2012; 751: 287-303.
- [35] Pannuru P, Dontula R, Khan AA, Herbert E, Ozer H, Chetty C, Lakka SS. miR-let-7f-1 regulates SPARC mediated cisplatin resistance in medulloblastoma cells. *Cell Signal.* 2014 Oct;26(10):2193-201.
- [36] Koga K, Yokoi H, Mori K, Kasahara M, Kuwabara T, Imamaki H, Ishii A, Mori KP, Kato Y, Ohno S, Toda N, Saleem MA, Sugawara A, Nakao K, Yanagita M, Mukoyama M. MicroRNA-26a inhibits TGF- $\alpha$ -induced extracellular matrix protein expression in podocytes by targeting CTGF and is downregulated in diabetic nephropathy. *Diabetologia.* 2015 Sep;58(9):2169-80.



- [37] Wang Q, Xu C, Zhao Y, Xu Z, Zhang Y, Jiang J, Yan B, Gu D, Wu M, Wang Y, Liu H. miR-26b-3p Regulates Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cell Proliferation by Targeting Estrogen Receptor. *Stem Cells Dev.* 2016 Mar 1;25(5):415-26.
- [38] Kumar B, Khaleghzadegan S, Mears B, Hatano K, Kudrolli TA, Chowdhury WH, Yeater DB, Ewing CM, Luo J, Isaacs WB, Marchionni L, Lupold SE. Identification of miR-30b-3p and miR-30d-5p as direct regulators of androgen receptor signaling in prostate cancer by complementary functional microRNA library screening. *Oncotarget.* 2016 Nov 8;7(45):72593-72607.
- [39] Fan J, Li H, Nie X, Yin Z, Zhao Y, Chen C, Wang DW. MiR-30c-5p ameliorates hepatic steatosis in leptin receptor-deficient (db/db) mice via down-regulating FASN. *Oncotarget.* 2017 Jan 9. [Epub ahead of print]
- [40] Liu MX, Zhou KC, Cao Y. MCRS1 overexpression, which is specifically inhibited by miR-129\*, promotes the epithelial-mesenchymal transition and metastasis in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer.* 2014 Nov 6;13:245. doi: 10.1186/1476-4598-13-245.
- [41] Gu JJ, Zhang JH, Chen HJ, Wang SS. MicroRNA-130b promotes cell proliferation and invasion by inhibiting peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  in human glioma cells. *Int J Mol Med.* 2016 Jun;37(6):1587-93.
- [42] Chang RM, Xu JF, Fang F, Yang H, Yang LY. MicroRNA-130b promotes proliferation and EMT-induced metastasis via PTEN/p-AKT/HIF-1 signaling. *Tumour Biol.* 2016 Aug;37(8):10609-19.
- [43] Lou K, Chen N, Li Z, Zhang B, Wang X, Chen Y, Xu H, Wang D, Wang H. MicroRNA-142-5p Overexpression Inhibits Cell Growth and Induces Apoptosis by Regulating FOXO in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Oncol Res.* 2017 Jan 2;25(1):65-73
- [44] Xia B, Hou Y, Chen H, Yang S, Liu T, Lin M, Lou G. Long non-coding RNA ZFAS1 interacts with miR-150-5p to regulate Sp1 expression and ovarian cancer cell malignancy. *Oncotarget.* 2017 Jan 14. doi: 10.18632/oncotarget.14663. [Epub ahead of print].
- [45] Zhu DL, Guo Y, Zhang Y, Dong SS, Xu W, Hao RH, Chen XF, Yan H, Yang SY, Yang TL. A functional SNP regulated by miR-196a-3p in the 3'UTR of FGF2 is associated with bone mineral density in the Chinese Population. *Hum Mutat.* 2017 Mar 19. doi:10.1002/humu.23216. [Epub ahead of print]
- [46] Yan B, Guo JT, Zhu CD, Zhao LH, Zhao JL. miR-203b: a novel regulator of MyoD expression in tilapia skeletal muscle. *J Exp Biol.* 2013 Feb 1;216(Pt 3):447-51.

- [47] Liu W, Dong Z, Liang J, Guo X, Guo Y, Shen S, Kuang G, Guo W. Downregulation of Potential Tumor Suppressor miR-203a by Promoter Methylation Contributes to the Invasiveness of Gastric Cardia Adenocarcinoma. *Cancer Invest.* 2016 Nov 25;34(10):506-516.
- [48] Wang X, Li F, Zhou X. miR-204-5p regulates cell proliferation and metastasis through inhibiting CXCR4 expression in OSCC. *Biomed Pharmacother.* 2016 Aug;82:202-7.
- [49] Luan W, Qian Y, Ni X, Bu X, Xia Y, Wang J, Ruan H, Ma S, Xu B. miR-204-5p acts as a tumor suppressor by targeting matrix metalloproteinases-9 and B-cell lymphoma-2 in malignant melanoma. *Onco Targets Ther.* 2017 Feb 27;10:1237-1246.
- [50] Lee KH, Lin FC, Hsu TI, Lin JT, Guo JH, Tsai CH, Lee YC, Lee YC, Chen CL, Hsiao M, Lu PJ. MicroRNA-296-5p (miR-296-5p) functions as a tumor suppressor in prostate cancer by directly targeting Pin1. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Sep;1843(9):2055-66.
- [51] Lee H, Shin CH, Kim HR, Choi KH, Kim HH. MicroRNA-296-5p Promotes Invasiveness through Downregulation of Nerve Growth Factor Receptor and Caspase-8. *Mol Cells.* 2016 Dec 8. doi: 10.14348/molcells.2017.2270. [Epub ahead of print]
- [52] Xu C, Li S, Chen T, Hu H, Ding C, Xu Z, Chen J, Liu Z, Lei Z, Zhang HT, Li C, Zhao J. miR-296-5p suppresses cell viability by directly targeting PLK1 in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep.* 2016 Jan;35(1):497-503.
- [53] Chen W, Wang J, Liu S, Wang S, Cheng Y, Zhou W, Duan C, Zhang C. MicroRNA-361-3p suppresses tumor cell proliferation and metastasis by directly targeting SH2B1 in NSCLC. *J Exp Clin Cancer Res.* 2016 May 10;35:76.
- [54] Zhang X, Wei C, Li J, Liu J, Qu J. MicroRNA-361-5p inhibits epithelial-to-mesenchymal transition of glioma cells through targeting Twist1. *Oncol Rep.* 2017 Mar;37(3):1849-1856. doi: 10.3892/or.2017.5406.
- [55] Sun C, Li S, Zhang F, Xi Y, Wang L, Bi Y, Li D. Long non-coding RNA NEAT1 promotes non-small cell lung cancer progression through regulation of miR-377-3p-E2F3 pathway. *Onco-target.* 2016 Aug 9;7(32):51784-51814.
- [56] Bou Kheir T, Futoma-Kazmierczak E, Jacobsen A, Krogh A, Bardram L, Hother C, Grønbæk K, Federspiel B, Lund AH, Friis-Hansen L. miR-449 inhibits cell proliferation and is down-regulated in gastric cancer. *Mol Cancer.* 2011 Mar 18;10:29.
- [57] Fededa JP, Esk C, Mierzwa B, Stanyte R, Yuan S, Zheng H, Ebnet K, Yan W, Knoblich JA, Gerlich DW. MicroRNA-34/449 controls mitotic spindle orientation during mammalian cortex development. *EMBO J.* 2016 Nov 15;35(22):2386-2398.

- [58] Huang X, Lu S. MicroR-545 mediates colorectal cancer cells proliferation through up-regulating epidermal growth factor receptor expression in HOTAIR long non-coding RNA dependent. *Mol Cell Biochem.* 2017 Mar 31. doi: 10.1007/s11010-017-2974-4. [Epub ahead of print]
- [59] Shi Y, Qiu M, Wu Y, Hai L. MiR-548-3p functions as an anti-oncogenic regulator in breast cancer. *Biomed Pharmacother.* 2015 Oct;75:111-6.
- [60] Chen H, Sun JG, Cao XW, Ma XG, Xu JP, Luo FK, Chen ZT. Preliminary validation of ERBB2 expression regulated by miR-548d-3p and miR-559. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Aug 7;385(4):596-600.
- [61] Gan X, Liu Z, Tong B, Zhou J. Epigenetic downregulated ITGBL1 promotes non-small cell lung cancer cell invasion through Wnt/PCP signaling. *Tumour Biol.* 2016 Feb;37(2):1663-9.
- [62] Yang W, Zhou C, Luo M, Shi X, Li Y, Sun Z, Zhou F, Chen Z, He J. MiR-652-3p is upregulated in non-small cell lung cancer and promotes proliferation and metastasis by directly targeting Lgl1. *Oncotarget.* 2016 Mar 29;7(13):16703-15.
- [63] Guo M, Jiang Z, Zhang X, Lu D, Ha AD, Sun J, Du W, Wu Z, Hu L, Khadarian K, Shen J, Lin Z. miR-656 inhibits glioma tumorigenesis through repression of BMPR1A. *Carcinogenesis.* 2014 Aug;35(8):1698-706.
- [64] Li S, Fang Y, Qin H, Fu W, Zhang X. miR-659-3p is involved in the regulation of the chemotherapy response of colorectal cancer via modulating the expression of SPHK1. *Am J Cancer Res.* 2016 Sep 1;6(9):1976-1985.
- [65] Stigliani S, Scaruffi P, Lagazio C, Persico L, Carlini B, Varesio L, Morandi F, Morini M, Gigliotti AR, Esposito MR, Viscardi E, Cecinati V, Conte M, Corrias MV. Deregulation of focal adhesion pathway mediated by miR-659-3p is implicated in bone marrow infiltration of stage M neuroblastoma patients. *Oncotarget.* 2015 May 30;6(15):13295-308.
- [66] Piscopo P, Grasso M, Fontana F, Crestini A, Puopolo M, Del Vescovo V, Venerosi A, Calamandrei G, Vencken SF, Greene CM, Confaloni A, Denti MA. Reduced miR-659-3p Levels Correlate with Progranulin Increase in Hypoxic Conditions: Implications for Frontotemporal Dementia. *Front Mol Neurosci.* 2016 May 3;9:31.
- [67] Rademakers R, Eriksen JL, Baker M, Robinson T, Ahmed Z, Lincoln SJ, Finch N, Rutherford NJ, Crook RJ, Josephs KA, Boeve BF, Knopman DS, Petersen RC, Parisi JE, Caselli RJ, Wszolek ZK, Uitti RJ, Feldman H, Hutton ML, Mackenzie IR, Graff-Radford NR, Dickson DW.

Common variation in the miR-659 binding-site of GRN is a major risk factor for TDP43-positive frontotemporal dementia. *Hum Mol Genet.* 2008 Dec 1;17(23):3631-42.

[68] Dmitriev P, Barat A, Polesskaya A, O'Connell MJ, Robert T, Dessen P, Walsh TA, Lazar V, Turki A, Carnac G, Laoudj-Chenivesse D, Lipinski M, Vassetzky YS. Simultaneous miRNA and mRNA transcriptome profiling of human myoblasts reveals a novel set of myogenic differentiation-associated miRNAs and their target genes. *BMC Genomics.* 2013 Apr 18;14:265.

[69] Luo G, Zhou Y, Yi W, Yi H. Expression levels of JNK associated with polymorphic lactotransferrin haplotypes in human nasopharyngeal carcinoma. *Oncol Lett.* 2016 Aug;12(2):1085-1094.

[70] Borzi C, Calzolari L, Centonze G, Milione M, Sozzi G, Fortunato O. mir-660-p53-mir-486 Network: A New Key Regulatory Pathway in Lung Tumorigenesis. *Int J Mol Sci.* 2017 Jan 23;18(1).

[71] Wang C, Gu S, Cao H, Li Z, Xiang Z, Hu K, Han X. miR-877-3p targets Smad7 and is associated with myofibroblast differentiation and bleomycin-induced lung fibrosis. *Sci Rep.* 2016 Jul 22;6:30122.

[72] Liang Y, Zhao G, Tang L, Zhang J, Li T, Liu Z. MiR-100-3p and miR-877-3p regulate overproduction of IL-8 and IL-1 $\beta$  in mesangial cells activated by secretory IgA from IgA nephropathy patients. *Exp Cell Res.* 2016 Oct 1;347(2):312-21.

[73] Kong X, Qian X, Duan L, Liu H, Zhu Y, Qi J. microRNA-372 Suppresses Migration and Invasion by Targeting p65 in Human Prostate Cancer Cells. *DNA Cell Biol.* 2016 Dec;35(12):828-835.

[74] Saha T, Hossain MS, Saha D, Lahiri M, Talukdar P. Chloride-Mediated Apoptosis-Inducing Activity of Bis(sulfonamide) Anionophores. *J Am Chem Soc.* 2016; 22;138(24):7558-67.